
DIE ROLLE VON STRIATUM UND HIPPOCAMPUS IM SEQUENTIELLEN LERNEN:

Interaktion, Dissoziation oder Konkurrenz?

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSEN-
SCHAFTEN (DR. RER. NAT.)

DEM FACHBEREICH PSYCHOLOGIE
DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG
VORGELEGT VON
DIPL. PSYCH. MORITZ THEDE ECKART

Philipps



Universität
Marburg

DIE NEUE BIOLOGIE DES GEISTES WIRD DIE NATÜRLICHE BRÜCKE SEIN ZWISCHEN
DEN GEISTESWISSENSCHAFTEN, DIE MIT DEM WESEN DER MENSCHLICHEN
EXISTENZ BEFASST SIND, UND DEN NATURWISSENSCHAFTEN, DIE SICH UM DIE
NATUR DER PHYSISCHEN WELT KÜMMERN.

(Kandel 2008)

1. DANKSAGUNG	9
2. ZUSAMMENFASSUNG	13
3. EINLEITUNG	17
3.1. ALLGEMEINE MODELLE ZU NEURONALEN GRUNDLAGEN SEQUENTIELLEN LERNENS.....	19
3.1.1. ALLGEMEINE ANNAHMEN ZU UNTERSCHIEDLICHEN GEDÄCHTNISYSTEMEN UND DEREN NEURONALEN GRUNDLAGEN	19
3.1.2 SEQUENTIELLES LERNEN ALS EINE FORM NICHTDEKLARATIVEN/PROZEDURALEN LERNENS	20
3.1.3. DOYON & UNGERLEIDER	20
3.1.4. GRAYBIEL.....	21
3.1.5. PACKARD & KNOWLTON.....	21
3.2. EXPERIMENTELLE OPERATIONALISIERUNG SEQUENTIELLEN LERNENS: DIE „SERIELLE REAKTIONSZEIT-AUFGABE“ (SRTT).....	23
3.3. SRTT-STUDIEN ÜBER DIE NEURONALEN GRUNDLAGEN SEQUENTIELLEN LERNENS: EXPERIMENTE IM HUMANBEREICH.....	25
3.3.1 BASALGANGLIEN	25
3.3.2. HIPPOCAMPUS.....	26
3.3.3. CEREBELLUM	27
3.3.4. KORTEX.....	28
3.4. SRTT-STUDIEN ÜBER DIE NEURONALEN GRUNDLAGEN SEQUENTIELLEN LERNENS: EXPERIMENTE IM TIERMODELL	29
3.4.1. WARUM EIN TIERMODELL?	29
3.4.2. SRTT-MODELLE FÜR NICHT-MENSCHLICHE PRIMATEN.....	30
3.4.3. NAGERMODELLE.....	31
3.4.4. NICHTDEKLARATIVES LERNEN IM NAGERMODELL	31
3.4.5. SRTT-NAGERMODELLE.....	32
3.5. ZUSAMMENSPIEL VON STRIATUM UND HIPPOCAMPUS IM NICHTDEKLARATIVEN LERNEN: INTERAKTION, DISSOZIATION ODER KONKURRENZ?	38
4. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	45
5. ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONEN	49
5.1. STUDIE I: 6-HYDROXYDOPAMINE LESIONS IN THE RAT NEOSTRIATUM IMPAIR SEQUENTIAL LEARNING IN A SERIAL REACTION TIME TASK.....	51
5.2. STUDIE II: ACQUISITION AND PERFORMANCE IN A RAT SEQUENTIAL REACTION TIME TASK IS NOT AFFECTED BY SUBTOTAL VENTRAL STRIATAL 6-OHDA LESIONS.....	53
5.3. STUDIE III: DORSAL HIPPOCAMPAL LESIONS BOOST PERFORMANCE IN THE RAT SEQUENTIAL REACTION TIME TASK.....	55
6. PUBLIKATIONEN	59
STUDIE I: 6-HYDROXYDOPAMINE LESIONS IN THE RAT NEOSTRIATUM IMPAIR SEQUENTIAL LEARNING IN A SERIAL REACTION TIME TASK	61
STUDIE II: ACQUISITION AND PERFORMANCE IN A RAT SEQUENTIAL REACTION TIME TASK IS NOT AFFECTED BY SUBTOTAL VENTRAL STRIATAL 6-OHDA LESIONS	75
STUDIE III: DORSAL HIPPOCAMPAL LESIONS BOOST PERFORMANCE IN THE RAT SEQUENTIAL REACTION TIME TASK (IN VORBEREITUNG)	83
7. DISKUSSION	115
7.1. SEQUENTIELLES LERNEN UND STRIATALE DOPAMINERGE PROZESSE (STUDIE I & II) ...	117

7.1.1. <i>STUDIE I</i>	117
7.1.2. <i>STUDIE II</i>	117
7.1.3. <i>MODELL FÜR DIE ROLLE DOPAMINERGER STRIATALER PROZESSE IM SEQUENTIELLEN LERNEN DER RATTE</i>	118
7.1.4. <i>KLINISCHE IMPLIKATIONEN AUS STUDIE I & II</i>	119
7.2. SEQUENTIELLES LERNEN UND DORSALER HIPPOCAMPUS (STUDIE III)	120
7.2.1. <i>STUDIE III</i>	120
7.2.2. <i>WEITERE STUDIEN, IN DENEN SICH VERBESSERTE LEISTUNGEN NACH HIPPOCAMPALEN LÄSIONEN ZEIGTEN</i>	120
7.3. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION VON STUDIE I, II UND III	122
7.4.1. <i>ERKLÄRUNGSMODELL</i>	123
7.4.2. <i>ALTERNATIVE ERKLÄRUNGEN</i>	124
7.4.3. <i>INTERFERENZEFFEKTE IM HUMANBEREICH</i>	125
7.5. ZUSAMMENFASSENDE BEWERTUNG DES RATTEN-SRTT.....	126
7.6. OFFENE FRAGEN UND WEITERE SRTT-EXPERIMENTE	127
8. LITERATURVERZEICHNIS	129
9. ANHANG	141
9.1. ABLAUF DER SHAPINGPHASE.....	143
9.2. CURRICULUM VITAE	145
9.3. AKADEMISCHE TÄTIGKEITEN UND LEISTUNGEN	147
9.3. PUBLIKATIONEN – INDIVIDUELLE LEISTUNG	151
9.3.1. <i>STUDIE I</i>	151
9.3.2. <i>STUDIE II</i>	151
9.3.3. <i>STUDIE III</i>	151
9.4. ERKLÄRUNG	153

ABKÜRZUNGEN:

6-OHDA: 6-Hydroxydopamin

fMRT: funktionelle Magnetresonanztomographie

FR: Fixed Ratio

HPLC-EC: Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie [High Performance Liquid Chromatography] mit elektrochemischer Detektion

MPTP: 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin

MRT: Magnetresonanztomographie

PET: Positronen-Emissions-Tomographie

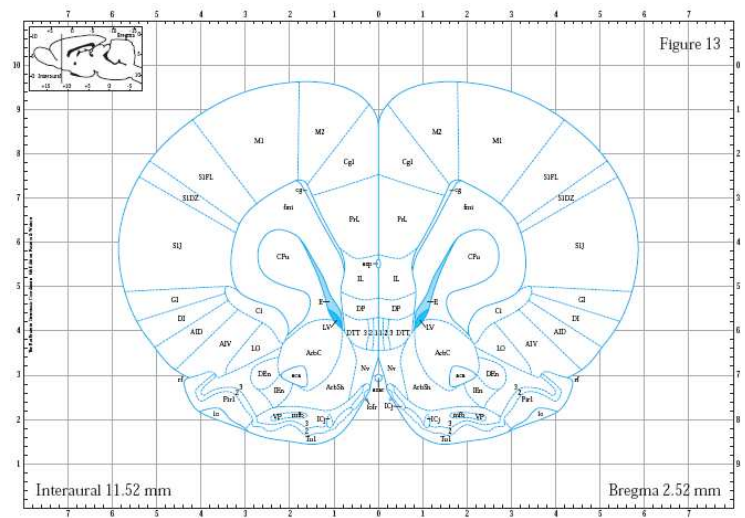
SRTT: Serielle Reaktionszeit-Aufgabe [serial reaction time task]

S-R: Stimulus-Response

TMS: transkranielle Magnetstimulation

Die Abbildungen zur Illustration der Kapitelüberschriften sind aus Paxinos und Watson (2007) entnommen.

DANKSAGUNG



1. DANKSAGUNG

DANKSAGUNG

DANKSAGUNG

Klaus Holzkamp schrieb in seiner „Grundlegung der Psychologie“ (1985) über das Verhältnis zwischen gesellschaftswissenschaftlichen und biologischen Methoden in der Psychologie:

„WIR RÄUMEN ALLERDINGS EIN, DAß ES DEMJENIGEN, DER IN SEINEM DENKEN DER TRADITIONELLEN WISSENSCHAFTLICHEN ARBEITSTEILUNG VERHAFTET IST, SCHWER FALLEN MUß, DIES ZU BEGREIFEN [die biologische Fundierung der gesellschaftlichen Natur des Menschen]; UND ZWAR NICHT NUR DEM BIOLOGEN, DER IN DEN KATEGORIEN SEINER WISSENSCHAFT KEINE MÖGLICHKEIT SIEHT, SO ETWAS WIE >GESELLSCHAFTLICHKEIT< ABZUBILDEN, SONDERN AUCH DEM, WOMÖGLICH KRITISCHEN, SOZIALWISSENSCHAFTLER, DER MEINT, DIE ANALYSE GESELLSCHAFTLICHER PHÄNOMENE SCHLIEßE EIN NATURWISSENSCHAFTLICHES VORGEHEN AUS, UND DER DIE BEZEICHNUNG >BIOLOGISCH< LEDIGLICH ALS GEGENBEGRIFF ZU >GESELLSCHAFTLICH<, ODER GAR ZUR AUSGRENZUNG IRRELEVANTER BIS SCHÄDLICHER SICHTWEISEN BENUTZT, MITHIN GLAUBT, SICH UM BIOLOGISCHE TATBESTÄNDE WEDER KÜMMERN NOCH ETWAS DARÜBER WISSEN ZU MÜSSEN (UND SO LETZTENDLICH AUCH VON >GESELLSCHAFT< NICHT ALLZUVIEL VERSTEHT).“

In diesem Sinne möchte ich mich bei Prof. Dr. Rainer Schwarting sowie der gesamten AG Basalganglienfunktionen und -dysfunktionen dafür bedanken, dass mir die Gelegenheit geboten wurde mich tierexperimentell mit den neuronalen Grundlagen von Lern- und Gedächtnisprozessen auseinander zu setzen. Dies ermöglichte mir einen tieferen Einblick in die biopsychologische Grundlagenforschung in einem Fach, dass irgendwo zwischen Geistes- und Naturwissenschaften angesiedelt ist.

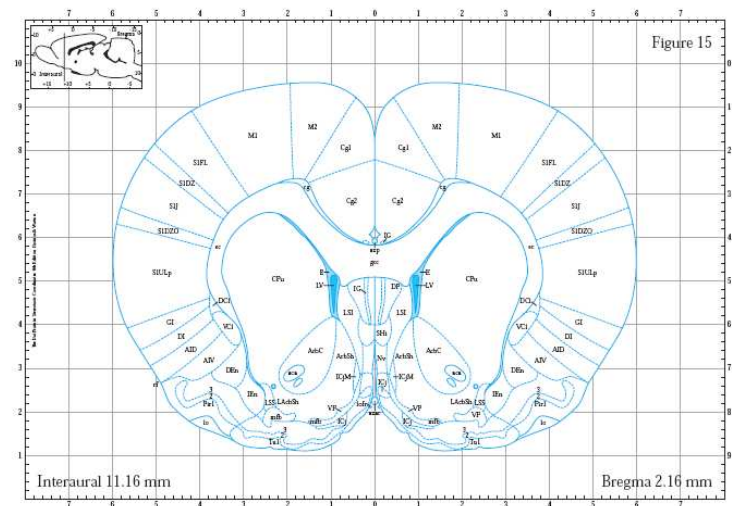
Mein besonderer Dank gilt Moriah Hülse-Matia, die mein Projekt drei Jahre lang begleitete und maßgeblich mit gestaltete.

Dipl. Psych. Rebecca McDonald und David Loer danke ich für die Arbeit, die sie in mein Projekt investiert haben.

Dipl. Biol. Dominik Seffer, Dr. Markus Wöhr, Mag. Christoph Wagenseil und Dr. Nico Conrad danke ich für das Gegenlesen der Arbeit und die vorgebrachten Verbesserungsvorschläge.

Prof. Dr. Claudio DaCunha und seinen MitarbeiterInnen danke ich für die Einblicke in ihre Forschungsgruppe, die die Fragestellung meiner Arbeit substantiell beeinflusst haben.

DANKSAGUNG



2. ZUSAMMENFASSUNG

ZUSAMMENFASSUNG

ZUSAMMENFASSUNG

Gängigerweise wird das Gedächtnis bei Säugetieren in zwei Kategorien unterteilt: das deklarative Gedächtnis, das semantische und episodische Inhalte enkodiert und für dessen Konsolidierung der Hippocampus eine zentrale Rolle spielt. Daneben das nichtdeklarative Gedächtnis, das sich in weitere Unterkategorien mit unterschiedlichen neuronalen Korrelaten unterteilen lässt. Eine dieser Unterkategorien bildet das prozedurale Gedächtnis, das für den Erwerb motorischer und kognitiver Fertigkeiten [skills] eine entscheidende Rolle spielt und vor allem mit striatalen Prozessen assoziiert ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die neuronalen Grundlagen sequentiellen Lernens – einer Unterkategorie prozeduralen Lernens – im Rattenmodell zu untersuchen. In Humanexperimenten wird sequentielles Lernen in der Regel über sogenannte serielle Reaktionszeitaufgaben [serial reaction time task (SRTT)] operationalisiert. In der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit kam daher eine Nagerversion des SRTT zur Anwendung.

In den ersten zwei Experimenten der vorliegenden Arbeit (STUDIE I & II) über die Rolle des Striatums im sequentiellen Lernen zeigte sich, dass dopaminerge Läsionen im dorsalen Striatum zu Defiziten im sequentiellen Lernen führen, wohingegen dopaminerge Läsionen im ventralen Striatum/Nucleus accumbens einen Einfluss auf instrumentelles Konditionieren haben, nicht jedoch auf sequentielles Lernen.

Die Frage, welche Rolle der Hippocampus bei nichtdeklarativen Gedächtnisfunktionen spielt, ist aufgrund von widersprüchlichen Ergebnissen aus Tier- und Humanstudien strittig. Es gibt Befunde, die für eine Dissoziation beider Systeme, einer Interaktion oder aber auch einer Konkurrenz sprechen.

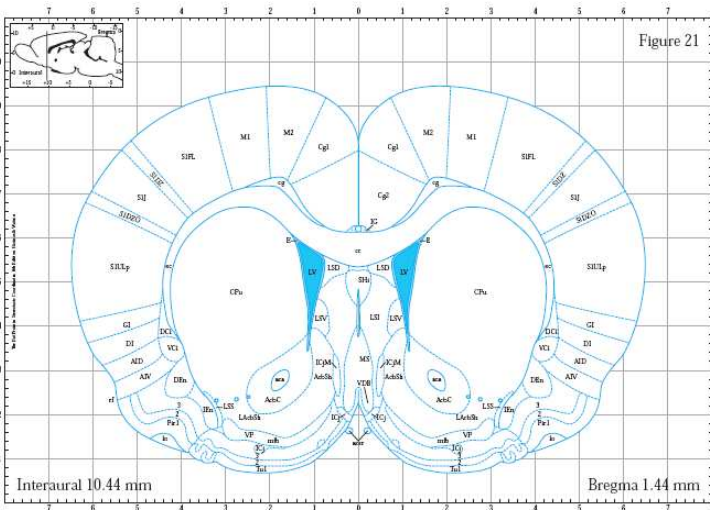
In dem dritten Experiment der vorliegenden Arbeit (STUDIE III) zeigte sich in dem Ratten-SRTT bei dorsal-hippocampal lädierten Ratten eine deutliche Verbesserung im instrumentellen wie auch beim sequentiellen Lernen, wobei nicht eindeutig unterschieden werden kann, ob die Läsionen einen direkten Einfluss auf sequentielles Lernen hatten oder nur indirekt über verbesserte Leistungen im instrumentellen Lernen.

Zusammenfassend werden die Ergebnisse dieser drei Experimente dahingehend diskutiert, dass eine Konkurrenz zwischen striatalen und hippocampalen Prozessen im instrumentellen und sequentiellen Lernen besteht. Eine mögliche Erklärung für diese Konkurrenz ist die gleichzeitige Projektion beider Strukturen in den frontalen Kortex. Da der Hippocampus bei Nagern insbesondere im räumlichen Lernen eine Rolle spielt, kann es bei Tests, in denen räumliche Informationen irrelevant sind, zu einer Interferenz zwischen Striatum und Hippocampus kommen. Nach hippocampalen Läsionen muss der frontale Kortex, der als zentrale Exekutive arbeitet, keine Ressourcen auf die Verarbeitung räumlicher Informationen aufwen-

ZUSAMMENFASSUNG

den, wodurch in Tests mit minimalen räumlichen Anforderungen prozedurale striatale Lernvorgänge effizienter ablaufen können.

EINLEITUNG



3. EINLEITUNG

EINLEITUNG

3.1. ALLGEMEINE MODELLE ZU NEURONALEN GRUNDLAGEN SEQUENTIELLEN

LERNENS

3.1.1. ALLGEMEINE ANNAHMEN ZU UNTERSCHIEDLICHEN GEDÄCHTNISYSTEMEN UND DEREN NEURONALEN GRUNDLAGEN

Bevor die neuronalen Grundlagen sequentiellen Lernens im Speziellen diskutiert werden, soll im folgenden Abschnitt ein genereller Überblick über eine mögliche Einteilung von Gedächtnissystemen und den assoziierten neuronalen Areale geliefert werden, da in der vorliegenden Arbeit ja gerade das Zusammenspiel zweier unterschiedlicher Strukturen – Striatum und Hippocampus –, die mit Lern- und Gedächtnisprozessen in Zusammenhang stehen, tierexperimentell untersucht wird.

Morris (2007) liefert in seinem Buch eine Taxonomie der Gedächtnissysteme bei Säugetieren (TABELLE 1). Hierbei wird betont, dass die gegenseitigen Abhängigkeiten bzw. Unabhängigkeiten dieser separaten Systeme bisher ungeklärt sind.

TABELLE 1: Taxonomie des Gedächtnissystems bei Säugern, angelehnt an Morris 2007

Deklaratives Gedächtnis		Nichtdeklaratives Gedächtnis			
Episodisches Gedächtnis	Semantisches Gedächtnis	Prozedurales Gedächtnis	Priming	Klassisches Konditionieren	Nicht-Assoziatives Lernen
<i>Hippocampus/ medialer Temporallappen</i>		<i>Striatum, motorischer Kortex, Cerebellum</i>	<i>Neokortex</i>	<i>Amygdala, Cerebellum</i>	<i>Reflexbögen</i>

Beim Menschen ist das deklarative Gedächtnis durch bewusste Gedächtnisinhalte [„knowing/remembering that“] – also Ereignisse (episodisch) und Fakten (semantisch) – definiert wobei deklarative Gedächtnisfunktionen anhand von Merkaufgaben wie z.B. dem Lernen von Wortlisten erfasst werden. Gelegentlich kommen aber auch räumliche Gedächtnistests zur Anwendung (z.B. Teng & Squire 1999).

Bei Experimenten mit Affen wird das deklarative hippocampusabhängige Gedächtnis i.d.R. durch „delayed matching to sample“-Aufgaben erfasst, bei Ratten mittels Tests zum räumlichen Lernen. Häufig verwendet werden hierfür die räumliche Version des „Morris Water Maze“ oder wie in STUDIE III der vorliegenden Arbeit sog. „Place Object Recognition Tests“ (siehe: Kart-Teke et al. 2006; eine Übersicht über unterschiedliche Testverfahren zur Erfassung deklarativer Gedächtnisinhalte findet sich bei Dere et al. 2006). Obwohl die deklarativen Gedächtnistests zwischen den Spezies recht unterschiedlich sind, sind die hippocam-

pale Anatomie sowie die Efferenzen und Afferenzen zwischen den Spezies sehr ähnlich. Ein Vergleich zwischen dem Aufbau des Hippocampus bei Mensch, Affe und Ratte findet sich bei Morris (2007) oder Squire (1992).

Das deklarative Gedächtnis wird alternativ auch als „relationales Gedächtnis“ bezeichnet, da es die Relationen zwischen Stimuli enkodiert.

Das nichtdeklarative Gedächtnis ist beim Menschen nicht bewusst zugänglich [„knowing/remembering how“]. Hierunter fallen motorische Fertigkeiten [motor skills], erlernte Dispositionen (Stimulus-Response (S-R) Assoziationen – oft auch als „Habit“ bezeichnet, siehe Ashby et al. 2010, Dickinson 1985), perzeptuelle oder kognitive Fertigkeiten [perceptual/cognitive skills] (z.B. Spiegellesen [mirror-reading task]) und Priming sowie einfache Formen nichtassoziativen Lernens und Sensitivierung.

3.1.2 SEQUENTIELLES LERNEN ALS EINE FORM NICHTDEKLARATIVEN/PROZEDURALEN LERNENS

„MANY OF THE REAL-WORLD SEQUENTIAL BEHAVIORS THAT WE LEARN, FROM WALKING TO GRAMMATICAL SPEAKING, APPEAR TO BE LEARNED UNINTENTIONALLY AND OFTEN WITHOUT EXPLICIT AWARENESS OF THE REQUISITE SEQUENTIAL REGULARITIES“

(Curran 1995)

Alltagsbeispiele, bei denen sequentielles Lernen eine zentrale Rolle spielt, sind Klavierspielen oder Autofahren (motorisches Sequenzlernen) oder Grammatik (kognitives Sequenzlernen). Nissen und Bullemer (1987) ordnen das sequentielle Lernen dem nichtdeklarativen¹ Lernen zu, da das Lernen im SRTT unabhängig von Defiziten im deklarativen Gedächtnis möglich ist. Motorisches sequentielles Lernen, in der Form wie es mittels SRTT operationalisiert wird, lässt sich zudem noch spezifischer dem prozeduralem Gedächtnis, also Erlernen von motorischen Fähigkeiten [motor skill learning] zuordnen (siehe hierzu Doyon & Ungerleider 2002). In den folgenden Abschnitten werden einige Theorien über die neuronalen Grundlagen sequentiellen Lernens vorgestellt.

3.1.3. DOYON & UNGERLEIDER

Doyon und Ungerleider (2002) präsentierten eine Theorie, in der unterschiedliche Stufen sequentiellen Lernens von motorischem Adaptationslernen (z.B. Greifaufgaben) abgegrenzt werden (siehe Doyon et al. 1996, 2002, 2003, Doyon & Ungerleider 2002).

¹ Oft wird das sequentielle Lernen auch dem „impliziten Lernen“ zugeordnet (siehe z.B. Curran 1995). Da die Einteilung implizites/explicit Gedächtnis bei Tieren keinen Sinn macht, werden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Begriffe deklarativ/nichtdeklarativ bzw. prozedural verwendet.

EINLEITUNG

- [I]** In der ersten Phase (Konsolidierungsphase, schnelle Lernfortschritte) sind hiernach Striatum, motorischer Kortex, Parietallappen und Cerebellum sowohl beim Sequenz- als auch beim Motoradaptationslernen aktiv.
- [II]** In der zweiten Phase (Automatisierung, langsames Lernen) sind bei beiden Lernformen nach wie vor motorischer Kortex und Parietallappen aktiv. Das Striatum jedoch ausschließlich beim Sequenzlernen, das Cerebellum hingegen beim motorischen Adaptationslernen.
- [III]** Nach einer zeitlichen Verzögerung (Retentionsphase) sind dann entweder ein kortikostriataler Schaltkreis [circuit] beim Sequenzlernen oder ein kortikocerebellarer Schaltkreis beim motorischen Adaptationslernen aktiv.

3.1.4. GRAYBIEL

Graybiel (1998) betont in ihrer Theorie über die Rolle der Basalganglien für Lernen und Gedächtnis die Rolle von motorischen Kortexarealen und des Striatums für sequentielles Verhalten. Nach dieser Theorie spielt das Striatum sowohl eine Rolle bei der Kodierung von S-R-Assoziationen als auch aufbauend auf den S-R-Assoziationen bei der Zusammenfassung [chunking] von motorischen und kognitiven Aktionen zu Aktionssequenzen. Hierbei kodiert der Nucleus caudatus einen Bewegungsplan, der den räumlichen und zeitlichen Verlauf der Sequenz enthält. Somit ist der Nucleus caudatus bei sequentiellem Verhalten für die Antizipation und Selektion der jeweils nächsten Bewegung relevant. Ob die Sequenzen letztendlich in den involvierten Kortexarealen oder dem Striatum repräsentiert werden, bleibt nach der Theorie offen. Graybiel geht aber davon aus, dass die dopaminerge Innervation des Striatums für den Aufbau der Repräsentationen (und somit sequentielles Lernen) zuständig ist.

3.1.5. PACKARD & KNOWLTON

Nach Packard und Knowlton (2002, siehe auch Yin & Knowlton 2006) ist bei Nagern das dorsale Striatum zuständig für S-R-Lernen, welches durch Belohnungen verstärkt wird, wobei das Belohnungssignal vermutlich durch das Dopamin ausgeführt wird. Diese Gedächtnisform erfordert langes Training, in dem sich ein gradueller Übergang von dem zunächst vorherrschenden ergebnisorientierten [outcome] Aktions-Wirkungs Lernen [action-outcome learning] hin zu dem stimulusgeleiteten S-R-Lernen vollzieht. Yin und Knowlton (2006) sprechen hier auch von Gewohnheitslernen [habitformation]. Explizit zum sequentiellen Lernen vermuten Packard und Knowlton, dass das mediale dorsale Striatum eine wichtige Rolle beim Aufbau der S-R-Komponenten der Sequenzen spielt.

EINLEITUNG

Diese Form des Lernens grenzen sie von deklarativem Lernen ab, bei dem der Hippocampus/mediale Temporallappen eine wichtige Rolle spielt. Im Gegensatz zum S-R-Lernen arbeitet das deklarative Gedächtnis wesentlich schneller – oft „one trial learning“ – und weist eine höhere Flexibilität gegenüber der Umwelt auf. Da die beiden beschriebenen Gedächtnissysteme parallel arbeiten, kann es zu einer konkurrierenden Aktivierung kommen, wobei das deklarative Lernen anfangs dominant ist (z.B. wenn die Ratte sich räumlich in einem Labyrinth orientiert). Mit längerem Training wird dann das Stimulus-Response-Lernen dominant (z.B. wenn die Ratte das Verhalten „geradeaus laufen und dann in den rechten Arm des Labyrinths abbiegen“ automatisiert hat). So kann beispielsweise in „win-stay“-Aufgaben, in denen das hoch automatisierte striatale Stimulus-Response-Lernen die effektivere Strategie ist, die Leistung nach hippocampalen Läsionen ansteigen, da das räumliche hippocampusabhängige Lernen in dieser spezifischen Aufgabe weniger effektiv ist².

Nach Packard und Knowlton (2002) unterscheidet sich das Striatum bei Primaten und Nagern wie folgt: Bei Primaten unterteilt man das Striatum in Nucleus caudatus und Putamen. Bei der Ratte gibt es hingegen keine solche eindeutige Differenzierung. Hier ist die Einteilung in ventrales und dorsales Striatum gebräuchlich, wobei das ventrale Striatum u.a. den Nucleus accumbens umfasst. Für das dorsale Striatum werden synonym auch die Begriffe Neostriatum oder seltener auch Nucleus caudatus verwendet.

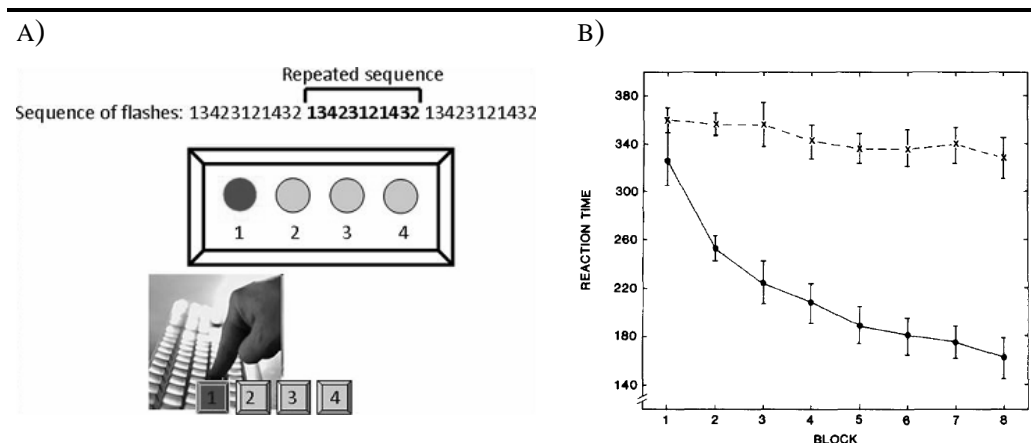
Für das Erlernen der S-R-Komponenten im sequentiellen Lernen ist nach Packard und Knowlton bei Nagern das mediale dorsale Striatum relevant.

Speziell für sequentielles Lernen beim Menschen postulieren Packard und Knowlton, dass explizites Wissen über die sequentielle Struktur mit implizitem sequentiellen Lernen interferieren kann.

² Kurzbeschreibung „win-stay“: In dieser Aufgabe muss die Ratte lernen, immer wieder den selben Arm eines Labyrinths zu betreten, um eine Belohnung zu erhalten.

3.2. EXPERIMENTELLE OPERATIONALISIERUNG SEQUENTIELLEN LERNENS: DIE „SERIELLE REAKTIONSZEIT-AUFGABE“ (SRTT)

1987 präsentierten Nissen und Bullemer erstmals die von ihnen entwickelte „Serielle Reaktionszeit-Aufgabe“ [serial reaction time task] (SRTT). In dem Test werden auf einem Bildschirm hintereinander an einer von vier möglichen Positionen visuelle Reize (z.B. eine „#“ oder ein Licht, siehe GRAPHIK 1A) präsentiert.



GRAPHIK 1: A) typische SRTT-Apparatur; B) Reaktionszeiten bei sequentieller und zufälliger Reizdarbietung nach Nissen & Bullemer 1987

Jeder der vier Positionen ist eine Taste zugeordnet. Aufgabe der Versuchspersonen ist es, möglichst schnell per Tastendruck auf die dargebotenen Reize zu reagieren. Typischerweise verlangsamen sich die Reaktionszeiten, wenn die Reizdarbietung von einer sich wiederholenden Sequenz (Sequenzlänge bei Nissen und Bullemer: 10 Items) auf zufällige Reizdarbietung wechselt (auch „Interferenz-Effekt“ genannt, siehe GRAPHIK 1B).

Um zu testen, inwieweit die Sequenzen explizit gelernt wurden, werden sogenannte Generierungsaufgaben [generation tasks] vorgegeben. In diesen Aufgaben wird den Versuchspersonen die zuvor trainierte Sequenz vorgegeben. Hierbei sollen die Versuchspersonen angeben, welches Item voraussichtlich als nächstes präsentiert wird. Die Ergebnisse solcher Generierungsaufgaben zeigen, dass sich die Versuchspersonen trotz der Reaktionszeitvorteile unter sequentieller Reizdarbietung der sequentiellen Abfolge nicht bewusst sind, da sie nicht explizit den Ablauf der Sequenz vorhersehen können (siehe z.B. Cohen et al. 1990, Wilkinson et al. 2009, Marvel et al. 2007).

EINLEITUNG

Inzwischen hat sich dieser Test, bzw. daran angelehnte Verfahren, als eine Standardmethode zur Erforschung visuomotorischen sequentiellen – oder allgemeiner impliziten oder prozeduralen – Lernens und Gedächtnisses sowie deren neuronalen Grundlagen etabliert.

3.3. SRTT-STUDIEN ÜBER DIE NEURONALEN GRUNDLAGEN SEQUENTIELLEN

LERNENS: EXPERIMENTE IM HUMANBEREICH

Ein erstes Experiment zu den neuronalen Grundlagen sequentiellen Lernens mit dem SRTT wurde von Nissen und Bullemer (1987) durchgeführt. In dieser Studie zeigten Korsakow-Syndrom-PatientInnen trotz mnestischer Defizite in der Wechsler-Memory-Scale intaktes sequentielles Lernen im SRTT. Seitdem ist eine Vielzahl an Publikationen mit unterschiedlichen Varianten des SRTTs erschienen, in denen entweder sequentielles Lernen bei neurologisch erkrankten PatientInnen oder in bildgebenden Verfahren neuronale Korrelate sequentiellen Lernens erfasst wurden. Hierbei wurden insbesondere die Rolle der Basalganglien³, des Hippocampus, des Cerebellums sowie unterschiedlicher kortikaler Areale untersucht. Eine ausführliche Zusammenfassung der mit sequentiellem Lernen assoziierten neuronalen Areale findet sich in den Übersichtsartikeln von Curran (1995) und Robertson (2007)⁴.

3.3.1 BASALGANGLIEN

Da die Basalganglien in allen Modellen zu sequentiellem Lernen eine wichtige Rolle spielen (s.o.), existiert eine Vielzahl von Studien, in denen bei PatientInnen mit Schädigungen der Basalganglien implizites Lernen anhand des SRTT erfasst wurde. Am häufigsten wurden PatientInnen mit Morbus Parkinson getestet (z.B. Wilkinson et al. 2009, Vandenbossche et al. 2009, Gawrys et al. 2008, Deroost et al. 2006, Smith & McDowall 2006, Smith & McDowall 2004, Werheid et al. 2003a/b, Helmuth et al. 2000, Jackson et al. 1995, Ferraro et al. 1993, Westwater et al. 1998, Sommer et al. 1999, Shohamy et al. 2005, Dominey et al. 1997, Dominey & Jeannerod 1997, Kelley et al. 2004; Metaanalyse: Siegert et al. 2006)

Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass die Defizite im impliziten/prozeduralen Lernen bei Parkinson schon in sehr frühen, sogenannten präsymptomatischen Phasen der Erkrankung auftreten, in denen die typischen motorischen Symptome (Lang & Lozano 1998a/b: Tremor, Rigidität, Akinese) noch nicht auftreten (Owen 2004, Camicioli et al. 2008, Leh et al. 2009, zur Diskussion über diese Annahme siehe auch Ogura et al. 2005).

Seltener wurden Studien mit Huntington- (z.B. Knopman & Nissen 1991), und SchizophreniepatientInnen⁵ (z.B. Marvel et al. 2007, Exner et al. 2006a, Dominey & Georgieff

³ Die neuroanatomischen Bezeichnungen erfolgen in Anlehnung an Trepel (2004)

⁴ Der Fokus der Arbeit liegt auf der Funktion von Basalganglien und Hippocampus im sequentiellen Lernen, weshalb die Ergebnisse zu den anderen erwähnten Hirnregionen nur kurz angerissen werden.

⁵ Anzumerken ist hier, dass bei schizophrenen Erkrankungen nicht nur die Basalganglien betroffen sind. Es wird aber vermutet, dass diese eine wichtige Rolle bei den beobachteten Defiziten im sequentiellen Lernen bei SchizophreniepatientInnen spielen (siehe Marvel et al. 2007, Perez-Costas et al. 2010, siehe aber auch Exner et al.

1997, Metaanalyse: Siegert et al. 2008) durchgeführt oder bei PatientInnen mit Zwangsstörungen [obsessive-compulsive disorder] (Rauch et al. 2007a/b, Goldman et al. 2008).

In diesen Studien an klinischen Stichproben konnten wiederholt Defizite im sequentiellen Lernen nachgewiesen werden. SRTT-Studien, in denen Versuchspersonen mit Schädigungen der Basalganglien keine Defizite im sequentiellen Lernen zeigten, bilden hingegen die Ausnahme (z.B. Smith et al. 2001). Eine Diskussion über widersprüchliche Ergebnisse findet sich bei Werheid et al. (2003b). Hier wird die Heterogenität der klinischen Stichproben als mögliche Ursache für die gegensätzlichen Befunde angeführt.

Auch in SRTT-Studien mit bildgebenden Verfahren⁶ zeigten sich während sequentiellen Lernens Aktivierungen der Basalganglien – insbesondere des Striatums (z.B. Werheid et al. 2003b, Albouy et al. 2008, Schendan et al. 2003, Doyon et al. 1996). Badgaiyan et al. (2007) fanden zudem einen Zusammenhang zwischen sequentiellem Lernen und striataler dopaminerger Aktivität.

3.3.2. HIPPOCAMPUS

Der Hippocampus spielt eine wichtige Rolle im deklarativen Gedächtnis (Stark 2007), wobei seine Funktion in der Gedächtniskonsolidierung liegt. In die Speicherung und den Abruf aus dem Langzeitgedächtnis ist der Hippocampus hingegen nicht involviert (Morris 2007).

Zur Untersuchung hippocampaler Funktionen werden i.d.R. Experimente mit amnestischen PatientInnen, bei denen auch der Hippocampus betroffen ist (z.B. Alzheimer oder Korsakow) oder Studien mit bildgebenden Verfahren durchgeführt (Stark 2007). Die Frage, welche Rolle der Hippocampus im sequentiellen Lernen spielt und insbesondere, ob er mit den Basalganglien interagiert, eine doppelte Dissoziation besteht oder beide Systeme in bestimmten Situationen sogar konkurrieren können, ist umstritten.

SRTT-Studien mit Versuchspersonen mit Schädigungen des Hippocampus liefern ein recht uneinheitliches Bild. In dem bereits zuvor erwähnten Experiment von Nissen und Bullemer (1987) zeigten Korsakow-PatientInnen intaktes sequentielles Lernen. Nagy et al. (2007) untersuchten sowohl Parkinson-PatientInnen als auch amnestische PatientInnen mit der Diagnose „leichte kognitive Beeinträchtigungen“ [mild cognitive impairments]. Hier zeigten sich bei den Parkinson-PatientInnen Defizite im sequentiellen Lernen, nicht aber bei den amnesti-

2006b zur Veränderungen des supplementärmotorischen Kortex bei Schizophrenen und dessen Rolle beim sequentiellen Lernen).

⁶ Z.T. bildgebende Untersuchungen zu sequentiellem Lernen bei klinischen Stichproben, deshalb wurden einige der hier aufgeführten Studien bereits weiter oben zitiert.

EINLEITUNG

schen PatientInnen. Auch bei Hopkins et al. (2004) zeigten amnestische PatientInnen intaktes sequentielles Lernen bei gleichzeitigen Defiziten im deklarativen Gedächtnis.

Ferraro et al. (1993) untersuchten ebenfalls Parkinson-PatientInnen und verglichen deren SRTT-Leistung mit der von Alzheimer-PatientInnen. Hier zeigten sich sowohl bei den Parkinson- als auch bei den Alzheimer-PatientInnen Defizite im sequentiellen Lernen. Lediglich ProbandInnen mit sehr milder Alzheimerdemenz zeigten intaktes sequentielles Lernen.

In funktionellen Magnetresonanztomographie-Studien (fMRT) zeigte sich immer wieder eine hippocampale Aktivierung im Zusammenhang mit sequentiellem Lernen. Schendan et al. (2003) fanden sowohl bei implizitem als auch explizitem Sequenzlernen eine hippocampale Aktivierung. Bei Albouy et al. (2008) zeigte sich eine parallele Aktivierung von Striatum und Hippocampus, wobei die hippocampale Aktivierung vor allem mit der Konsolidierung der gelernten Sequenzen (also der Leistungssteigerungen nach längeren Pausen) korrelierte. Ross et al. (2009) fanden eine hippocampale Aktivierung sowohl während sequentiellen Lernens als auch während des Abrufs zuvor gelernter Sequenzen.

In einem Experiment über das Zusammenspiel von implizitem und explizitem Lernen von Howard & Howard (2001) zeigten sich bei älteren Versuchspersonen Defizite im sequentiellen Lernen, wenn diese die Instruktion bekamen, zu versuchen die Sequenz explizit zu lernen (Die Kontrollgruppe wurde nicht über den sequentiellen Charakter der SRT-Aufgabe informiert). Diese Interferenz⁷ zwischen implizitem und explizitem Lernen zeigte sich nicht bei jüngeren Versuchspersonen.

3.3.3. CEREBELLUM

Doyon et al. (2002, 1996) untersuchten die Rolle des Cerebellums im sequentiellen Lernen im fMRT und mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Hier zeigte sich eine Aktivierung des Cerebellums vor allem in frühen Lernphasen. Mit weiterer Übung der Sequenz zeigte sich eine Verschiebung hin zu einer striatal-kortikalen Aktivierung. Die Annahme, dass das Cerebellum eine Rolle beim sequentiellen Lernen spielt, wird auch anhand von SRTT-Experimenten an klinischen Stichproben gestützt. So zeigten in Experimenten von Gómez-Beldarrain et al. (1998) und Dirnberger et al. (in Druck) PatientInnen mit Schädigungen des Cerebellums durch Schlaganfälle Defizite im sequentiellen Lernen.

⁷ Zu Beachten: der Begriff „Interferenz“ wird sowohl in Bezug auf den Leistungsabfall beim Wechsel von sequentieller zu zufälliger Reizdarbietung verwendet (siehe 3.2), als auch in Bezug auf den Leistungsabfall durch eine konkurrierende Aktivierung unterschiedlicher Gedächtnisprozesse wie in der hier zitierten Studie.

3.3.4. KORTEX

Im Zusammenhang mit sequentiellern Lernen zeigen sich i.d.R. in Experimenten mit bildgebenden Verfahren vor allem Aktivierungen sowohl im motorischen- bzw. supplementärmotorischen Kortex als auch in anderen frontalen kortikalen Arealen, die mit Handlungsregulation assoziiert sind (siehe hierzu u.a. Doyon et al. 2002, Postuna & Dagher 2006).

Der Zusammenhang von supplementärmotorischer kortikaler Aktivierung mit sequentiellern Verhalten konnte zudem von Kennerley et al. (2004) in einer transkraniellen Magnetstimulation-Studie (TMS) demonstriert werden.

Sowohl Beisir und Houk (1998) als auch Saint-Cry (2003) postulieren in ihren Modellen eine zentrale Rolle für ein frontostriatales Netzwerk im sequentiellen Lernen, das zudem Input aus dem motorischen Kortex und sensorischen kortikalen Arealen erhält.

3.4. SRTT-STUDIEN ÜBER DIE NEURONALEN GRUNDLAGEN SEQUENTIELLEN

LERNENS: EXPERIMENTE IM TIERMODELL

3.4.1. WARUM EIN TIERMODELL?

Studien im Humanbereich sind in ihrer Aussagekraft aufgrund von ethischen und methodischen Gründen stark eingeschränkt. So ist bei Experimenten mit neurologisch erkrankten PatientInnen nie genau zu klären, welche Areale und welche Transmittersysteme von der Erkrankung in welchem Umfang betroffen sind. In SRTT-Experimenten werden z.B. oft Parkinson-PatientInnen untersucht, da bei diesen die dopaminergen Neurone der nigrostriatalen Bahn, welche mit prozeduralem Lernen assoziiert sind (s.o.), aufgrund der Bildung von Lewy-Körpern degenerieren (Braak et al. 2004, Hornykiewicz 2008). Allerdings ist bei der Parkinsonerkrankung bei weitem nicht nur die nigrostriatale Bahn betroffen, sondern – je nach Schweregrad – darüber hinaus u.a. autonome, limbische und somatomotorische Systeme, die Medulla oblongata, das Tegmentum, der Bulbus olfactorius sowie weitere Areale des Mesencephalons und Prosencephalons und in späten Stadien der Erkrankung auch der Neokortex (Del Tredici et al. 2002, Owen 2004, Übersichtsartikel zum Ablauf der Parkinsonerkrankung: Braak et al. 2004). Darüber hinaus sind auch die von der Erkrankung betroffenen Transmittersysteme heterogen. Neben dem dopaminergen System degenerieren auch serotonerge und allgemein katecholaminerge Neurone in den betroffenen Regionen (Übersichtsartikel: Lang & Lozano 1998a/b). Hinzu kommt, dass der medikamentöse Einfluss bei neurologischen Stichproben oft außer Acht gelassen wird. Im Falle von Experimenten an ParkinsonpatientInnen werden die Experimente i.d.R. mit Versuchspersonen durchgeführt, die mit L-Dopa behandelt werden. So auch bei den SRTT-Studien an Parkinson-PatientInnen, die weiter oben in der vorliegenden Arbeit zitiert werden. Eine der wenigen Studien, die explizit den Zusammenhang von L-Dopa-Medikation und sequentiellem Lernen untersucht, wurde von Shohamy et al. (2005) durchgeführt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Defizite im sequentiellen Lernen nur bei Parkinson-PatientInnen auftraten, die nicht mit L-Dopa behandelt wurden. Ähnliche Probleme der Heterogenität der betroffenen Hirnstrukturen und der Medikation bestehen bei PatientInnen mit hippocampalen Schädigungen. So sind sowohl bei der Alzheimererkrankung als auch beim Korsakowsyndrom nicht nur der Hippocampus, sondern z.B. auch weitere kortikale Areale betroffen. Zusätzlich ist bei dem Korsakowsyndrom mit zu berücksichtigen, dass diesem meistens schwerer Alkoholabusus zugrunde liegt (Stark 2007).

Bildgebungsstudien beim Menschen können aus verständlichen Gründen nur korrelativ sein, d.h. aus ihnen kann keine Kausalität zwischen Hirnaktivierung und Funktion gefolgert werden.

Um die beschriebenen Limitationen von Experimenten an klinischen Stichproben und bildgebenden Verfahren umgehen zu können, sind manipulative Ansätze notwendig, die nur im tierexperimentellen Ansatz verfolgt werden können. Im Folgenden werden einige Tests zum sequentiellen bzw. prozeduralen Lernen im Affen- und Nagermodell diskutiert, wobei ausführlich auf den in der vorliegenden Arbeit angewandten Ratten-SRTT eingegangen wird.

3.4.2. SRTT-MODELLE FÜR NICHT-MENSCHLICHE PRIMATEN

Affenmodelle sequentiellen Lernens bieten sich an, da hier einerseits eine relativ große evolutionäre Nähe zum Menschen besteht, andererseits invasive Methoden angewendet werden können. Im Folgenden werden exemplarisch einige Studien vorgestellt, bei denen visuomotorisches sequentielles Lernen untersucht wurde.

In einer älteren Studie (Brody & Pribram 1978) konnte demonstriert werden, dass frontal kortikale Läsionen bei Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) sequentielles Lernen beeinflussen, hingegen aber auf zuvor erlernte Sequenzen keinen Einfluss haben. Allerdings wurden in diesem Experiment relativ kurze Sequenzen von zwei oder drei Items vorgegeben, und es fand kein Vergleich zu zufälliger Stimuluspräsentation statt. Auch Averbeck und Lee (2007) fanden bei einem Experiment mit Rhesusaffen mittels Zellpotentialableitungen eine Korrelation frontal kortikaler Aktivität und sequentiellen Lernens. Allerdings wurden auch hier lediglich Sequenzen von maximal drei Items vorgegeben.

Ein Affen-SRTT, der sich explizit an den Test von Nissen und Bullemer (1987) anlehnt, in dem auf einem Touch-Screen Sequenzen vorgegeben werden, wurde 2000 von Procyk et al. 2000a/b vorgestellt. Procyk et al. 2000b konnten mittels Zellpotentialableitungen eine Korrelation zwischen sequentiellen Lernen und der Aktivierung des anterioren Gyrus cinguli bei Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) nachweisen. Weitere Tests zum sequentiellen Lernen bei nicht-menschlichen Primaten finden sich in dem Übersichtsartikel von Conway und Christiansen (2001).

Als Nachteil der Studien im Affenmodell ist zu benennen, dass zum einen nur sehr kleine Stichproben untersucht werden (i.d.R. $N=2$) und sich die oft angewendete Zellpotentialableitung meistens auf kortikale Areale beschränkt (Eine der wenigen Ausnahmen siehe Fujii & Graybiel (2005), die Zellpotentiale in den Basalganglien bei sequentiellen sakkadischen Augenbewegungen ableiteten) und zudem auch nur korrelativ ist. Läsionsexperimente

sind bei Affen zwar möglich, werden im Vergleich zu Nagermodellen allerdings eher selten angewendet.

3.4.3. NAGERMODELLE

Ein Nagermodell sequentiellen Lernens ist aus mehreren Aspekten lohnenswert. Zunächst einmal lassen sich hier größere Stichproben testen. Darüber hinaus existieren gut validierte Nagermodelle für neurologische und psychische Erkrankungen bei denen sich im Humanbereich Zusammenhänge mit sequentiellem Lernen gezeigt haben, wie z.B. 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) oder 6-Hydroxydopamin-Modelle (6-OHDA) der Parkinsonerkrankung (Da Cunha et al. 2001, Da Cunha et al. 2009, Fornaguera et al. 1994a/b, Fornaguera & Schwarting 1999, Fornaguera & Schwarting 2002, Schwarting & Huston 1996a/b, Berger et al. 1991, Blandini et al. 2007), exitotoxische Amnesiemodelle (z.B. Ibotenatsäure, siehe de Hoz et al 2003, 2004), Amphetamin-Sensitivierungsmodelle oder ebenfalls exitotoxische Schizophreniemodelle (Peleg-Raibstein et al. 2009, Schwabe et al. 2006).

3.4.4. NICHTDEKLARATIVES LERNEN IM NAGERMODELL

Im Nagermodell existieren unterschiedliche Ansätze, die nichtdeklaratives Lernen im Allgemeinen untersuchen. Hierzu zählen z.B. Labyrinthaufgaben (erhöhtes Plus-Labyrinth [elevated plus maze]: Gil et al. 2007, das Wasserlabyrinth [water maze]⁸: Teather et al. 2005 oder Da Cunha et al. 2003) oder Skinnerboxen (z.B. Cho & Jeantet 2010).

Ein erster serieller Test ist der „5-choice serial reaction time task“ (Robbins 2002, Cole & Robbins 1989). Dieser Test wurde entwickelt, um Aufmerksamkeit und Impulsivität im Tiermodell zu operationalisieren (siehe z.B. Barbelivien et al. 2001). Im Gegensatz zum human SRTT handelt es sich jedoch nicht um einen Test zum sequentiellen Lernen (siehe hierzu auch Schwarting 2008).

Diese oft angewendeten Testverfahren bieten eine Vielzahl von Möglichkeiten, um die neuronalen Grundlagen unterschiedlicher Gedächtnissysteme gegeneinander abzugrenzen bzw. um deren Zusammenspiel zu untersuchen. Besonders oft kommt hier das Wasserlabyrinth zur Anwendung, da in diesem Test, je nach Testanordnung sowohl räumliches (deklaratives) als auch S-R-Lernen (nichtdeklaratives/prozedurales) untersucht werden kann [spatial- and cued version]⁹.

⁸ Es existieren mehrere Versionen des ursprünglich von Morris entwickelten „water maze“ (siehe Morris 2007). Zur Erfassung impliziten Lernens wird eine sogenannte „cued version“ eingesetzt, die in den zitierten Artikeln ausführlich beschrieben wird.

⁹ In dem Experiment von Da Cunha et al. 2003 werden z.B. Ratten mit entweder hippocampalen Läsionen oder Läsionen der nigrostriatalen Bahn in jeweils beiden Varianten getestet. Bei hippocampalen Läsionen zeigten sich

3.4.5. SRTT-NAGERMODELLE

Die zuvor beschriebenen Nagermodelle bieten zwar gute Möglichkeiten, um die neuronalen Grundlagen prozeduralen Lernens zu untersuchen, bzw. um deklarative Gedächtnissysteme von prozeduralen abzugrenzen. Da in den Tests keine Reizsequenzen vorgegeben werden, lassen sich hiermit allerdings keine Aussagen über sequentielles Lernen im Speziellen treffen. Studien, die sich mit sequenziellem Lernen befassen, sind im Nagermodell wesentlich seltener.

Eine Übersicht über Tiermodelle, insbesondere Nagermodelle für sequentielles Lernen, findet sich bei Schwarting (2008). In diesem Artikel werden die Tests in folgende Gruppen unterteilt:

1. Tests, die nicht zur Erforschung sequentiellen Lernens konzipiert wurden, aber zum Teil zur Operationalisierung sequentiellen Verhaltens eingesetzt werden – hierunter fallen viele Labyrinthtests, die Beobachtung angeborenen sequentiellen Verhaltens wie z.B. Putzen [grooming] oder der bereits zuvor erwähnte „5-choice serial reaction time task“.
2. Tests, die einige Aspekte des Human-SRTT abdecken. Hierunter fallen z.B. unterschiedliche Versionen des Radiallabyrinths, in dem die einzelnen Arme in sequentieller Reihenfolge besucht werden müssen.
3. Tests, die eine hohe Augenscheinvalidität zur Humanversion aufweisen. Mit diesen Tests lassen sich u.a. Interferenzeffekte und Sequenzen unterschiedlicher Komplexität testen – sogenannte Sequenzen erster Ordnung oder komplexere Sequenzen zweiter Ordnung (also Sequenzen, bei denen sich das folgende Item anhand des vorgehenden voraussagen lässt, oder Sequenzen, bei denen jeweils zwei aufeinanderfolgende Items das dritte vorhersagen, siehe hierzu auch Reed & Johnson 1994).

Im Folgenden werden drei operante Testverfahren zur Erfassung visuomotorischen sequentiellen Lernens im Nagermodell vorgestellt, die sich explizit an den SRTT von Nissen und Bullemer (1987) anlehnen und unter die von Schwarting (2008) beschriebenen Nagermodelle mit hoher Augenscheinvalidität zur Humanversion fallen.

Allen drei Modellen ist gemein, dass erstens das Durchbrechen einer Lichtschranke mit der Schnauze in einem jeweils illuminierten Loch [nose poke hole] dem Tastendrücken

Beeinträchtigungen im räumlichen Lernen, nicht aber im S-R-Lernen – bei nigrostriatal lädierten Tieren umgekehrt.

als Reaktion auf visuelle Stimuli in der Humanversion entspricht¹⁰ und zweitens die Interferenz zwischen sequentieller und zufälliger Reizdarbietung untersucht wird. Auf die ausführliche Vorstellung alternativer Testverfahren zur Erfassung sequentiellen oder seriellen Lernens wird an dieser Stelle verzichtet, da diese Tests vom Aufbau her wenig mit den für die vorliegende Arbeit zentralen SRTTs gemein haben (siehe z.B. Compton 2001 oder DeCoteau & Kesner 2000).

[I] Christie und Dalrymple-Alford (2004) entwarfen einen Ratten-SRTT, in dem vier Nose Poke Holes horizontal angeordnet sind. Pokes werden in diesem Test mittels intrakranieller Selbststimulation im medialen Vorderhirnbündel verstärkt. Vorgegeben werden Sequenzen mit 4, 8 oder 12 Items (4 Items: Sequenz erster Ordnung, 8 und 12 Items: Sequenz zweiter Ordnung). Bei Ratten mit striatalen Radiofrequenzläsionen zeigte sich lediglich bei den 4-Item-Sequenzen ein Interferenzeffekt (Reaktionszeitdefizite unter zufälliger Reizdarbietung gegenüber sequentieller Reizdarbietung). Bei 8 oder 12 Items zeigten sich hingegen keine Interferenzeffekte (keine Reaktionszeitunterschiede zwischen zufälliger und sequentieller Reizdarbietung). Bei Kontrolltieren und hippocampal lädierten Tieren (ebenfalls Radiofrequenzläsionen) zeigte sich hingegen bei allen drei Sequenzlängen ein Interferenzeffekt. Hieraus schlussfolgerten die Autoren, dass eine Dissoziation zwischen hippocampalem und striatalem Lernen vorliegt.

Kritisch ist an dieser Studie anzumerken, dass erstens durch die horizontale Anordnung der Nose Poke Holes die Distanz zwischen den Löchern relativ groß ist und somit motorische Defizite bei striatalen Läsionen als mögliche Erklärung der Effekte nicht ausgeschlossen werden können und zweitens Radiofrequenzläsionen als veraltet anzusehen sind, da diese unspezifische Gewebeschäden verursachen, wodurch neben den anvisierten Strukturen auch durchlaufende Faserverbindungen zerstört werden. Bei hippocampalen Läsionen sind daher Exitotoxine zu bevorzugen (siehe Jarrad 2002). Um speziell die Rolle des striatalen Dopamins auf sequentielles Lernen zu untersuchen, hätten sich Neurotoxine wie 6-OHDA oder MPTP angeboten (s.o.).

[II] Bailey und Mair (2006, 2007) entwarfen einen Ratten-SRTT mit 5 Nose Poke Holes, in dem Wasser als Verstärker eingesetzt wird. Auch in diesem Test sind die Nose Poke Holes horizontal angeordnet. Der Verstärker wird direkt nach jeder richtigen Reaktion in dem jeweiligen Nose Poke Hole verabreicht. Die vorgegebenen Sequenzen umfassen jeweils 5 Items (Sequenz erster Ordnung). Bei Ratten mit exitotoxischen Läsionen entweder des Striatums,

¹⁰ Im Folgenden werden diese Löcher als „Nose Poke Holes“ bezeichnet, da keine gängige deutsche Bezeichnung existiert.

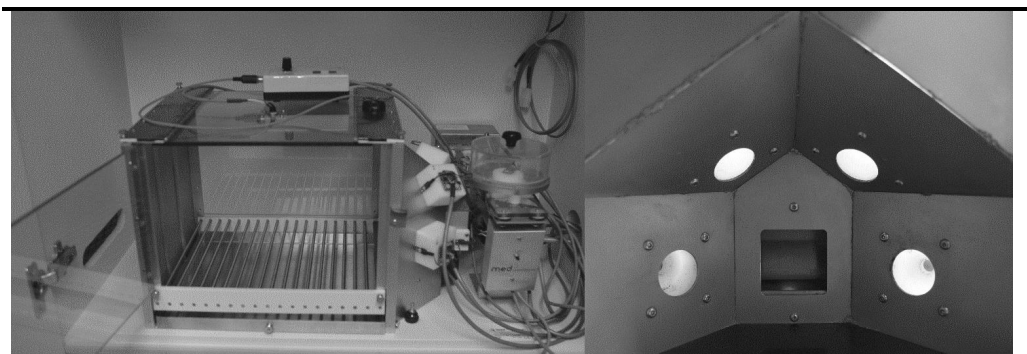
EINLEITUNG

des motorischen Kortex (M1), des supplementärmotorischen Kortex (M2) oder des frontalen Kortex zeigten sich Verlangsamungen bei den jeweils ersten Nose Pokes, die eine Sequenz einleiteten. Die sequentielle Leistung allgemein war jedoch im Vergleich zu Kontrolltieren nicht beeinträchtigt: alle Gruppen zeigten einen vergleichbaren Interferenzeffekt.

Zu kritisieren ist an dieser Studie die Anzahl von fünf Nose Poke Holes. Die Augenscheinvalidität zum Human-SRTT ist hierdurch gemindert. Ein noch gewichtigerer Kritikpunkt ist die Sequenzlänge von 5 Items, wenn man bedenkt, dass sich bei Sequenzen von vier Items bei Christie und Dalrymple-Alford (2004) bei striatal lädierten Tieren noch ein Interferenzeffekt zeigte, nicht jedoch bei 8 oder 12 Items.

[III] Eine erste Version eines weiteren Ratten-SRTT wurde 2005 von Domenger & Schwarting (2005, 2006, 2007, 2008) vorgestellt. Dieser Ratten-SRTT ist der zentrale Test in den drei Publikationen, die die Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden und wird deshalb im Folgenden en detail beschrieben.

Die aktuelle Version des Tests arbeitet mit modifizierten Skinnerboxen, in denen vier Nose Poke Holes mit LEDs und Lichtschranken in einer kleinen Alkove um den Futterspender [pellet receptacle] angebracht sind (oben links [1], oben rechts [2], unten links [3] unten rechts [4], siehe GRAPHIK 2). Diese Anordnung ist so gewählt, dass die Nose Poke Holes durch einfache Kopfbewegungen erreicht werden können, was hochautomatisierte, schnelle Reaktionen ermöglicht. Zudem sind die motorischen Anforderungen minimal.



GRAPHIK 2: Außen- und Innenansicht der modifizierten Skinnerboxen
(photographiert von Sara Förster)

Sobald die Ratte die Lichtschranke in dem illuminierten Loch durchbrochen hat, wird das nächste Loch aktiviert. Wie in der Humanversion folgt die Illuminierung der Löcher ent-

EINLEITUNG

weder einer sich immer wiederholenden 12er-Sequenz zweiter Ordnung (3-2-4-1-3-4-2-1-2-3-1-4).¹¹ oder pseudozufällig¹².

Der wohl größte Unterschied zu der Humanversion ist, dass die Ratten während der Testdurchführung für richtige Reaktionen belohnt werden müssen. Nach jeweils 13 richtigen Reaktionen erhalten die Tiere Futterpillen über den Futterspender (Fixed ratio 13 (FR 13)). Dadurch, dass die Sequenz eine Länge von 12 Items hat und auf einer FR 13 verstärkt wird, sind Sequenz und Belohnung dissoziiert – sprich die Belohnung wird immer an einer jeweils anderen Stelle der Sequenz gegeben.

Um die FR 13 zu erreichen, ist vor dem eigentlichen Testbeginn eine Vorbereitungsphase [shaping] nötig, die bei FR1 anfängt und in der das FR-Kriterium nach und nach angehoben wird (Das Shaping wird im Anhang ausführlich beschrieben). Um die Ratten zusätzlich zu motivieren und die Reaktionszeiten zu steigern, werden gegen Ende der Shapingphase falsche Reaktionen oder das Ausbleiben einer Reaktion über 5 s mit einem milden aversiven Reiz bestraft (Licht und Ton). Nach der Bestrafung werden die FR und die Sequenz von der unterbrochenen Stelle an fortgesetzt. Nach der 13. korrekten Reaktion, beträgt das Zeitlimit eine Minute, um den Tieren die Möglichkeit zu geben, die Pellets zu konsumieren.

Anschließend beginnt die Trainingsphase, in der jede Ratte 20 min pro Tag auf der Sequenz trainiert wird, bis keine weiteren Lernerfolge mehr nachweisbar sind (i.d.R. so lange, bis die jeweilige Experimentalgruppe keine Reaktionszeitzuwächse über drei aufeinanderfolgende Trainingstage zeigt).

Wenn das Training abgeschlossen ist, wird die sequentielle Leistung gegen die Leistung unter pseudozufälliger Reizdarbietung getestet. Hierfür wird ein sogenannter „S-R-S-R“-Test durchgeführt, in dem über einen Zeitraum von 20 min alle 5 min zwischen sequentieller und pseudozufälliger Reizdarbietung gewechselt wird. In diesem Test haben die Tiere nach wie vor ein Zeitlimit von 5 s pro Reaktion, allerdings wird das jeweils aktive Loch nur für eine Sekunde illuminiert. Diese verkürzte Illuminationszeit ist dazu gedacht, um Tieren, die automatisierte sequentielle Reaktionen zeigen, einen relativen Vorteil während der sequentiellen Reizdarbietung zu verschaffen. Ein Tier, das automatisiert antwortet, sollte selbst wenn das Loch nicht mehr beleuchtet ist, eine richtige Reaktion zeigen können. In einem zweiten Test („Sequence Violation Test“¹³) wird wie in der Trainingsphase 20 min die Sequenz vorgegeben. Ab der 5. min werden dann einige Fehler in die Sequenz eingebaut, indem gelegent-

¹¹ Sequenzen mit vergleichbaren Längen und Anordnungen werden auch in der Humanversion verwendet (z.B. Rauch et al. 2007a/b, Vandenbossche et al. 2009, Gawrys et al. 2008, Werheid et al. 2003b; Exner et al. 2006a/b).

¹² Bei der pseudozufälligen Reihenfolge wird nie das selbe Loch hintereinander aktiviert.

¹³ Da keine deutsche Bezeichnung existiert, wird der englische Begriff verwendet.

EINLEITUNG

lich ein Item der Sequenz an der Position 9 der FR 13 übersprungen wird. Hier wird erstens erhoben, wie sich die Reaktionszeiten an der Position 9 verändern, wenn ein Item übersprungen wird, und zweitens, wie oft die Tiere einen erwarteten Fehler – also einen Poke in das Loch, das übersprungen wurde – machen. Letzteres Maß wird als Indikator für die Automatisierung sequentiellen Verhaltens gewertet.

In einer pharmakologischen Studie (Domenger & Schwarting 2006) in der entweder der D1-Rezeptorantagonist (SKF 83566) oder der D2-Rezeptorantagonist (Raclopride) nach der sequentiellen Trainingsphase (also vor den Testungen) systemisch appliziert wurden, zeigten sich bei beiden Antagonisten eine dosisabhängige Reduzierung der Nose-Poke-Raten bis hin zum kompletten Ausbleiben instrumenteller Antworten.

Bei Ratten, die noch instrumentelle Reaktionen zeigten, resultierte die SKF 83566-Applikation (D1) in einem Wegfallen der Reaktionszeitvorteile unter sequentieller Reizdarbietung gegenüber zufälliger Reizdarbietung, wohingegen in der Fehlerrate nach wie vor ein – im Vergleich zur Vehikelinjektion z.T. sogar erhöhter – Interferenzeffekt¹⁴ beobachtbar war.

Die Applikation von Raclopride (D2) hatte zwar Auswirkungen auf instrumentelles Verhalten allgemein, nicht jedoch auf den beobachteten Interferenzeffekt. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Dopamin nicht nur eine allgemeine Rolle beim instrumentellen Lernen spielt, sondern insbesondere D1 auch speziell beim sequentiellen Lernen.

In einem weiteren Experiment wurden nach dem sequentiellen Training mittels 6-OHDA Läsionen im Striatum gesetzt (Domenger & Schwarting 2008), die im Durchschnitt einen dopaminergen Verlust von ca. 60% im lateralen Neostriatum und ca. 40% im medialen Neostriatum verursachten. Die Läsionen führten zu generellen Defiziten im instrumentellen Verhalten (reduzierte Antwortraten und Reaktionszeiten). Diese Defizite korrelierten mit dem Dopaminverlust.

Im „Sequence Violation Test“ zeigten die lädierten Tiere weniger automatisierte Antworten, allerdings genau wie die Kontrolltiere erhöhte Reaktionszeiten an den fehlerhaften Positionen. Die lädierten Tiere konnten zudem ihre Reaktionszeitvorteile unter sequentieller Reizdarbietung im Vergleich zu zufälliger Reizdarbietung nach den Läsionen nicht aufrechterhalten, hingegen aber die niedrigere Fehlerrate unter sequentieller Reizdarbietung.

Ein wichtiges Ergebnis ist aber vor allem, dass sich bei den lädierten Tieren nach der Operation im Gegensatz zur Kontrollgruppe ihre sequentielle Leistung nicht weiter steigerte. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass dopaminerge Prozesse im Striatum eher für sequentielles Lernen wichtig sind, als für sequentielle Performanz. Diese Annahme deckt sich

¹⁴ Interferenzeffekt: Verlangsamung der Reaktionszeit (bzw. Anstieg der Fehlerrate), wenn die Reizdarbietung von sequentiell auf zufällig wechselt, siehe 3.2.

EINLEITUNG

mit dem „computational model“ zu sequentiellern Lernen von Ashby et al. (2007). Nach diesem Modell ist bei sequentiellern Lernen zunächst ein Kortex-Striatum-Kortex-Schaltkreis relevant. Im Verlauf des Trainings wird die Kontrolle sequentiellen Verhaltens graduell an einen schnelleren Kortex-Kortex Schaltkreis abgegeben.

3.5. ZUSAMMENSPIEL VON STRIATUM UND HIPPOCAMPUS IM NICHTDEKLARATIVEN LERNEN: INTERAKTION, DISSOZiation ODER KONKURRENZ?

Wie aus den vorausgegangenen Ausführungen ersichtlich wird, herrscht in der aktuellen Literatur relative Einigkeit darüber, dass das Striatum eine zentrale Rolle bei prozeduralen und sequentiellen Lern- und Gedächtnisprozessen spielt, der Hippocampus hingegen bei der Konsolidierung deklarativer Gedächtnisinhalte.

Weitaus strittiger ist hingegen die Frage über das Zusammenspiel der beiden Strukturen im prozeduralen oder speziell beim sequentiellen Lernen. Handelt es sich um zwei interagierende oder dissoziierte Gedächtnissysteme (nach Schwarting 2008 ist der Hippocampus bzw. Temporallappen in die Akquisition Sequenzen höherer Ordnung – also z.B. Sequenzen zweiter Ordnung – involviert) oder sind (wie bereits unter Punkt 3.1.5 bei Packard & Knowlton angeklungen) Situationen denkbar, in denen beide Systeme konkurrieren? (siehe hierzu auch Leh et al. 2009.)

TABELLE 2 gibt einen Überblick über bisherige Publikationen zu Human- und Nagerexperimenten, die sich explizit mit dem Zusammenspiel von Hippocampus und Striatum befassen. Im Humanbereich werden in der Auflistung nur Studien berücksichtigt, die sich an den von Nissen und Bullemer (1987) entwickelten SRTT anlehnen. Da bei Nagerexperimenten zu dieser Fragestellung nur wenige Studien vorliegen, die sich methodisch an das Modell von Nissen und Bullemer anlehnen, werden auch solche Studien berücksichtigt, die sich mit nichtdeklarativem Lernen allgemein befassen.

Die Resultate der vorgestellten Studien sind bestenfalls als uneinheitlich zusammenzufassen. Übereinstimmungen finden sich lediglich in den drei zitierten fMRT-Studien: Schedan et al. (2003), Albouy et al. (2008) und Gheysen et al. (2010) fanden beim sequentiellen Lernen eine hippocampale Aktivierung bzw. eine Korrelation zwischen hippocampaler Aktivierung und sequen tiellem Lernen. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass sowohl eine Interaktion als auch eine Konkurrenz zwischen beiden Strukturen eine gleichzeitige Aktivierung von Hippocampus und Striatum erwarten lassen würde. Auch eine Korrelation hippocampaler Aktivierung mit sequen tiellem Lernen schließt noch nicht aus, dass die hippocampale Aktivität in Konkurrenz zu striatalen Lernvorgängen steht. Lediglich bei einer Dissoziation würde man keine hippocampale Aktivierung während des prozeduralen SRTT-Lernens erwarten.

In Studien an klinischen Stichproben mit Schädigungen des Hippocampus oder der Basalganglien hingegen finden sich sowohl Ergebnisse, die eine Dissoziation (Nissen & Bullemer 1987, Knoppmann & Nissen 1990, Hopkins et al. 2004, Nagy et al. 2007) als auch eine

Interaktion (Ferraro et al. 1993) nahe legen, wobei die Studie von Ferraro et al. darauf hindeutet, dass Beeinträchtigungen im impliziten Lernen im SRTT erst ab einem gewissen Schweregrad hippocampaler Schädigung auftreten. Hinweise auf eine Interferenz zwischen implizitem und explizitem Lernen finden sich lediglich bei Howard & Howard 2001 in einem reinen Verhaltensexperiment, allerdings nur bei älteren Versuchspersonen.

Experimente mit Nagern zur Rolle von Striatum und Hippocampus beim nichtdeklarativen Lernen werden meistens mit dem Wasserlabyrinth (Morris Watermaze) durchgeführt. In einem Experiment von Gill et al. (2007) zeigte sich während S-R-Lernens im Wasserlabyrinth bei Ratten in der frühen Genexpression eine Aktivierung von Hippocampus und Striatum, beim räumlichen Lernen nur eine Aktivierung des Hippocampus¹⁵. Auch hier ist wieder anzumerken, dass eine parallele Aktivierung von Hippocampus und Striatum sowohl eine Interaktion als auch eine Konkurrenz zwischen beiden Systemen bedeuten kann. Bei Teather et al. 2005 zeigte sich hingegen bei einem sehr ähnlichen Experimentalaufbau beim S-R-Lernen lediglich eine Aktivierung des Striatums.

Bei Da Cunha et al. (2003) zeigten hippocampal lädierten Ratten im S-R-Lernen im Wasserlabyrinth keine Defizite, aber im räumlichen Lernen. Bei striatal lädierten Tieren trat der gegenteilige Effekt auf. DeCoteau & Kesner (2000) testeten Ratten mit medialen sowie lateralen striatalen und hippocampalen Läsionen im deklarativen und prozeduralen Sequenzlernen im Radiallabyrinth. Tiere mit medial striatalen Läsionen zeigten Defizite im prozeduralen, nicht aber im deklarativen Sequenzlernen – hippocampal lädierte Tiere umgekehrt. Tiere mit Läsionen im lateralen Striatum zeigten in den angewendeten Tests keine Defizite.

Packard (Packard & McGaugh 1996, Packard 1999) testete Ratten im Pluslabyrinth auf die Dominanz von räumlichen [place learning] oder Response-Lernstrategien. Sowohl eine Inaktivierung des Striatums durch Lidocain, als auch eine Erhöhung hippocampaler Aktivität durch Glutamininjektion in den Hippocampus während der Testphasen führte zu einer Dominanz von räumlichem Lernen. Bei hippocampaler Inaktivierung durch Lidocain bzw. striatalen Glutamininjektionen zeigte sich eine erhöhte Tendenz zu Response-Lernstrategien.

McDonald und White (1994) fanden bei striatal lädierten Ratten Defizite im S-R-Lernen und bei fornixlädierten Ratten Defizite im räumlichen Lernen bei gleichzeitigen Leistungsvorteilen im S-R-Lernen gegenüber nicht operierten Kontrolltieren. Lee et al. (2008) fanden hingegen bei hippocampal lädierten Mäusen Leistungsvorteile im Stimulus-Response-Lernen und Defizite im räumlichen Lernen im Wasserlabyrinth. Bei Läsionen des Striatums zeigten sich umgekehrte Effekte.

¹⁵ Zur Beschreibung der räumlichen und S-R-Variate des Wasserlabyrinths siehe Rossato et al. (2006).

EINLEITUNG

Weiterhin fand sich bei Cho & Jeantet (2010) in instrumentellen Konditionierungsaufgaben bei Ratten eine Dissoziation zwischen striatalen und hippocampalen Läsionen – ebenso in einer Rattenversion des SRTT von Christine & Dalrymple-Alford (2004, diese Studie wurde bereits unter Punkt 3.4.5 diskutiert und kritisiert).

TABELLE 2: Studien aus dem Human- und Nagerbereich, die sich mit dem Zusammenspiel (Dissoziation, Interaktion, Konkurrenz) von Striatum und Hippocampus befassen.

Im Humanbereich beschränkt sich die Auflistung auf Studien, die sich methodisch an das SRTT-Modell von Nissen und Bullemer anlehnen.

Da im Tiermodell nur sehr wenige SRTT-Studien existieren, werden hier allgemein Studien über das Zusammenspiel von Hippocampus und Striatum im nichtdeklarativen Lernen (vor allem zum S-R-Lernen) aufgeführt.

Dissoziation: Humanstudien

Autoren	Jahr	Methodisches Vorgehen	Ergebnisse
Nissen & Bullemer	1987	SRTT bei Korsakow (hippocampale Schädigungen) und	<u>Korsakow</u> : eindeutige Interferenzeffekte im SRTT nachweisbar
Knoppmann & Nissen	1990	Huntington-PatientInnen (Schädigungen der Basalganglien)	<u>Huntington</u> : reduziertes sequentielles Lernen
Hopkins et al.	2004	Deklaratives und prozedurales Sequenzlernen bei amnestischen PatientInnen mit hippocampalen Schädigungen	Amnestische PatientInnen weisen im Vergleich zur Kontrollgruppe Defizite im deklarativen, nicht aber im prozeduralen Lernen auf.
Nagy et al.	2007	Sequenzlernen bei Parkinson- und Amnesie-PatientInnen	<u>Parkinson</u> : Defizite im Lernen von Serien von S-R-Assoziationen, nicht aber deren sequentieller Anordnung <u>Amnesie</u> : nicht-sequentielles Assoziationslernen, Hinweise auf Verlust von Kontextinformationen

Dissoziation: Tierstudien			
Autoren	Jahr	Methodisches Vorgehen	Ergebnisse
Packard & McGaugh	1996	Ratten wurden in einem Pluslabyrinth trainiert. Es wurde untersucht, welchen Einfluss eine hippocampale oder striatale Deaktivierung durch Lidocain auf räumliches Lernen bzw. Response-Lernen hat	Inaktivierung des Striatums erhöht die Tendenz zu räumlichem Lernen, Inaktivierung des Hippocampus zu Response-Lernen
Packard	1999	Testaufbau von Packard & McGaugh (1996): Verstärkung hippocampaler oder striataler Aktivität durch Glutaminjektionen	<u>Hippocampal erhöhte Aktivierung:</u> erhöhte Tendenz zu räumlichem Lernen <u>Striatum erhöhte Aktivierung:</u> Vice versa
DeCoteau & Kesner	2000	Deklaratives und prozedurales Sequenzlernen im Radiallabyrinth bei medial striatalen, lateral striatalen und hippocampal lädierten Ratten	<u>Medial striatale Läsionen:</u> Defizite im prozeduralen, nicht aber im deklarativen Lernen <u>Lateral striatale Läsionen:</u> keine Defizite <u>Hippocampale Läsionen:</u> Defizite im deklarativen, nicht aber im prozeduralen Lernen
Da Cunha et al.	2003	Nigrostriatal und hippocampal lädierte Ratten in der „cued version“ (S-R-Lernen) und „spatial version“ (räumliches Lernen) des Wasserlabyrinths	<u>Nigrostriatale Läsionen:</u> Defizite im S-R-Lernen, nicht aber im räumlichen Lernen <u>Hippocampale Läsionen:</u> Vice versa
Christie & Dalrymple-Alford	2004	Striatum und hippocampal lädierte Tiere in einem Ratten-SRTT	<u>Striatum Läsionen:</u> Interferenzeffekt bei Sequenzen mit 4 Items, kein Interferenzeffekt bei längeren Sequenzen (8 oder 12 Items) <u>Hippocampale Läsionen:</u> Interferenzeffekt bei allen vorgegebenen Sequenzlängen
Teather et al.	2005	Ratten wurden entweder in der „cued version“ oder der „spatial version“ des Wasserlabyrinths trainiert. Anschließend wurde die neuronale Aktivität in Striatum und Hippocampus anhand der frühen Genexpression untersucht.	<u>Cued version:</u> erhöhte Aktivierung im Striatum <u>Spatial version:</u> erhöhte Aktivierung im Hippocampus
Cho & Jeantet	2010	Mäuse mit dorsal striatalen und hippocampalen Läsionen wurden in unterschiedlichen instrumentellen Konditionierungsaufgaben getestet	<u>Striatum Läsionen:</u> keine Defizite im instrumentellen Lernen <u>Hippocampale Läsionen:</u> Defizite in der Inhibition

Interaktion: Humanstudien

Autoren	Jahr	Methodisches Vorgehen	Ergebnisse
Ferraro et al.	1993	SRTT bei Gesunden, Parkinson-PatientInnen und PatientInnen mit unterschiedlichen Alzheimerstadien (sehr milde und milde Demenz)	<u>Sehr milde Demenz</u> : keine Defizite im sequentiellen Lernen <u>Milde Demenz und Parkinson</u> : Defizite im sequentiellen Lernen
Schendan et al.	2003	fMRT-Analyse während implizitem sequentiellen und expliziten SRTT-Training	Hippocampale Aktivierung während implizitem und explizitem „higher order“ Sequenzlernen
Robertson	2007	„Toolbox“-Artikel über den SRTT	<u>Relevante Strukturen für SRTT-Lernen</u> : präfrontaler Kortex, Striatum, Cerebellum Bei „higher order sequences“ ist zudem der mediale Temporallappen involviert, auch wenn die Sequenzen nichtdeklarativ gelernt werden
Albouy et al.	2008	fMRT-Analyse während Training und nach Konsolidierungsphasen in einem okkultomotorischen SRTT	Hippocampus- und Striatum-Aktivität korrelieren mit der Konsolidierung des impliziten Sequenzlernens
Gheysen et al.	2010	fMRT-Analyse während Sequenzlernens (Vorgegeben wurden explizit nicht räumliche Sequenzen von Farbcodes)	Hippocampale Aktivierung während früher und später Lernphase (u.a. auch Aktivierung von Striatum, Cerebellum und kortikalen Arealen)

Interaktion: Tierstudien

Autoren	Jahr	Methodisches Vorgehen	Ergebnisse
Gill et al.	2007	Ratten wurden entweder auf räumliches oder Stimulus-Response Lernen im Pluslabyrinth trainiert. Anschließend wurde die neuronale Aktivität in Striatum und Hippocampus anhand der frühen Genexpression untersucht	<u>Hippocampus</u> : erhöhte Aktivierung bei räumlichem und S-R-Lernen <u>Dorsales Striatum</u> : erhöhte Aktivierung bei S-R-Lernen

Konkurrenz: Humanstudien

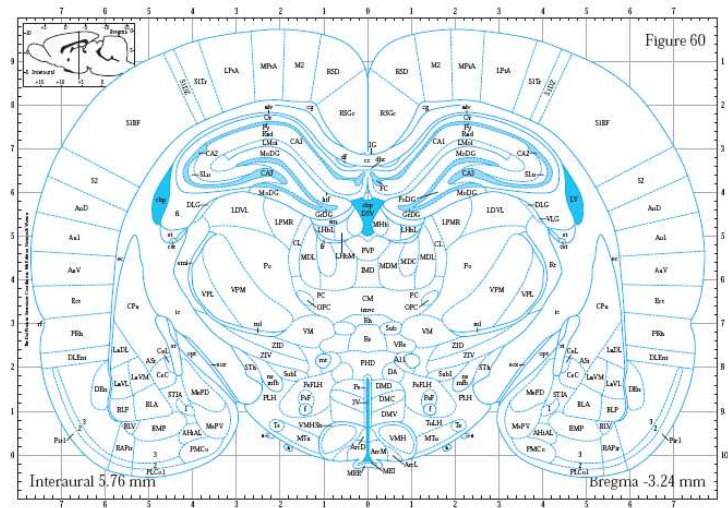
Autoren	Jahr	Methodisches Vorgehen	Ergebnisse
Howard & Howard	2001	junge (20-23 Jahre) und alte (60-80 Jahre) Versuchspersonen wurde eine künstliche Grammatik-Version des SRTT getestet. Die Hälfte der Versuchspersonen wurde über den seriellen Charakter der Aufgabe informiert und zudem instruiert zu versuchen, diesen zu entdecken	Bei jungen Versuchspersonen hatte die Instruktion zu versuchen die Regelmäßigkeit zu entdecken keine Auswirkungen Ältere Versuchspersonen verschlechterten sich im impliziten Lernen, wenn sie gleichzeitig versuchten Regelmäßigkeit der Aufgabe zu erkennen

Konkurrenz: Tierstudien

Autoren	Jahr	Methodisches Vorgehen	Ergebnisse
McDonald & White	1994	Fornix und striatal lädierte Ratten wurden in einer „cued version“ und einer „spatial version“ des Wasserlabyrinths getestet	<u>Striatale Läsionen:</u> Defizite im S-R-Lernen <u>Fornix Läsionen:</u> Defizite im räumlichen Lernen, aber Vorteile im S-R-Lernen
Packard & Knowlton	2002	Übersichtsartikel	In experimentalen Settings, in denen S-R-Lernen die effektivste Strategie ist, kann es bei hippocampalen Läsionen zu Leistungssteigerungen kommen, wenn räumliches Lernen die effektivste Strategie ist hingegen bei striatalen Läsionen.
Lee et al.	2008	Hippocampal und striatal lädierte Mäuse wurden in einer „cued version“ und einer „spatial version“ des Wasserlabyrinths getestet	<u>Striatale Läsionen:</u> Defizite im S-R-Lernen, aber Vorteile im räumlichen Lernen <u>Hippocampale Läsionen:</u> Defizite im räumlichen Lernen, aber Vorteile im S-R-Lernen

Anmerkung:

Die Einteilung nach den gefundenen Effekten Dissoziation, Interaktion oder Konkurrenz erfolgt anhand der Interpretation der Ergebnisse durch die jeweiligen AutorInnen



4. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

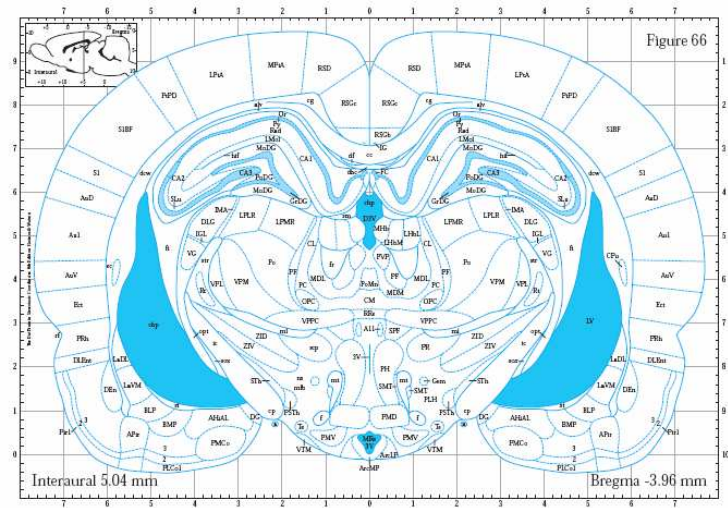
Der in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Ratten-SRTT wurde inzwischen in mehreren Studien validiert bzw. angewendet (Domenger & Schwarting 2005, 2006, 2007, 2008). Einer der Vorteile dieses Modells ist, dass es eine hohe Augenscheinvalidität zur Humanversion aufweist. Bei diesem Test sind sowohl der Aufbau (z.B. visuomotorischer SRTT, vier Wahlmöglichkeiten, vorgegebene Sequenzlänge) sowie die beobachtbaren Verhaltenseffekte (Interferenzeffekt) mit der Humanversion vergleichbar.

Eine erste pharmakologische Studie zeigte, dass die Performanz durch dopaminerge Antagonisten beeinflussbar ist (Domenger & Schwarting 2006). Eine Läsionsstudie, in der nach der sequentiellen Trainingsphase das Striatum mit 6-OHDA lädiert wurde, legte zudem die Vermutung nahe, dass die dopaminergen Prozesse in den Basalganglien eher beim sequentiellen Lernen als bei der Performanz bereits gelernter Sequenzen eine Rolle spielen (Domenger & Schwarting 2008, eine ausführliche Beschreibung der Studien findet sich unter 3.4.5).

Anknüpfend an diese Befunde ergab sich die Frage, welche Rolle dopaminerge striatale Prozesse im sequentiellen Lernen spielen. In der ersten Studie der vorliegenden Arbeit wurden daher striatale 6-OHDA-Läsionen vor dem sequentiellen Training gesetzt. Da nach Packard und Knowlton (2002) speziell das mediale dorsale Striatum in sequentielles Lernen involviert ist, wurde das Neurotoxin in eben diesen Teil des Striatums injiziert (STUDIE I).

Der Nucleus accumbens, (oder allgemeiner das ventrale Striatum, das in STUDIE I nicht von den Läsionen betroffen war) wird mit Stimulus-Belohnungslernen (Packard & Knowlton 2002) oder generell klassischer und instrumenteller Konditionierung (Alcaro et al. 2007) assoziiert. Daraus resultierte die Annahme, dass 6-OHDA-Läsionen im ventralen Striatum zwar das instrumentelle Verhalten im SRTT beeinflussen, hingegen aber keinen Einfluss auf sequentielles Lernen haben. Diese Annahme sollte in STUDIE II getestet werden. Da keine spezifischen Hypothesen zu einzelnen Strukturen des ventralen Striatums vorlagen – wie z.B. die Schalen- oder Kernregion des Nucleus accumbens betreffend – wurde allgemein das ventrale Striatum lädiert.

Welche Rolle der Hippocampus im sequentiellen Lernen spielt, wurde bisher im Tiermodell nur wenig untersucht. Aufgrund der widersprüchlichen Publikationen über das Zusammenspiel von Striatum und Hippocampus sind sowohl eine Interaktion, eine Dissoziation als auch eine Konkurrenz zwischen beiden Strukturen denkbar. In STUDIE III wurde daher der Einfluss von Ibotenatsäure-Läsionen im dorsalen Hippocampus auf die Leistung im SRTT untersucht. Die Läsionen wurden auf den dorsalen Hippocampus beschränkt, da dieser bei der Ratte mit kognitiven Funktionen assoziiert ist, der ventrale Hippocampus hingegen mit emotionalen Prozessen (Bast et al. 2003, Bast 2007, Fanselow & Dong 2010).



5. ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONEN

ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONEN

5.1. STUDIE I: 6-HYDROXYDOPAMINE LESIONS IN THE RAT NEOSTRIATUM IMPAIR SEQUENTIAL LEARNING IN A SERIAL REACTION TIME TASK

Aufgrund der Annahme von Packard und Knowlton (2002), dass die dopaminergen Prozesse des medialen dorsalen Striatums mit sequentiellern Lernen assoziiert sind, wurden in diesem Experiment bilaterale mediale, dorsal striatale 6-OHDA Läsionen gesetzt. Da sich in einem vorherigen Läsionsexperiment, in dem die Läsionen nach dem sequentiellen Training gesetzt wurden nur geringe Auswirkungen striataler 6-OHDA Läsionen auf die Performanz sequentiellen Verhaltens zeigten (Domenger & Schwarting 2008), wurde in STUDIE I der Einfluss striataler Läsionen auf sequentielles Lernen untersucht, indem die Tiere erst lädiert und dann auf der 12-Item-Sequenz trainiert wurden.

Die Läsionsstärke wurde nach Abschluss aller Verhaltenstests mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion (HPLC-EC) untersucht. Hierbei zeigten sich in der Kontrollgruppe im Vergleich zu nicht-operierten oder scheinoperierten Kontrolltieren die stärksten dopaminergen Verluste von 58-66% im medialen dorsalen Striatum. Im lateralen dorsalen Striatum zeigten sich Verluste von 45-50%, im ventralen Striatum 20-23 %. Dass sich beim Serotonin keine Unterschiede fanden, deutet darauf hin, dass die Läsionen selektiv dopaminerg waren.

In einem Katalepsietest ließen sich bei den lädierten Tieren keine generellen motorischen Defizite nachweisen. In „activity box“-Testungen zeigten sich moderate Defizite in der Lokomotion, von denen sich die Tiere im Verlauf des Experiments aber weitestgehend erholten. Zudem konnte hier eine verminderte Reaktivität der lädierten Tiere auf Amphetamin festgestellt werden, was aufgrund der dopaminergen Läsionen erwartet wurde.

Die Ratten wurden 19 Tage lang auf der Sequenz trainiert. In dieser Trainingsphase zeigten sowohl die lädierten Tiere, als auch die Kontrolltiere über den Verlauf eine kontinuierliche Leistungssteigerung (Reduktion von Reaktionszeiten und Fehlerrate). Die Leistungen der lädierten Tiere waren hierbei in beiden Variablen signifikant schlechter, als die der Kontrollgruppe. In einem anschließenden „S-R-S-R Test“, in dem die Leistung unter sequentieller Reizdarbietung gegen die unter zufälliger Reizdarbietung getestet wurde, zeigten die lädierten Tiere ebenfalls eine reduzierte Leistung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem zeigte sich in der Kontrollgruppe ein signifikanter Interferenzeffekt von sowohl erhöhten Reaktionszeiten als auch erhöhten Fehlerraten unter zufälliger Reizdarbietung. Bei den lädierten Tieren zeigte sich in den Reaktionszeiten kein und in der Fehlerrate ein reduzierter Interferenzeffekt. Im „Sequence Violation Test“ zeigten die Kontrolltiere an den fehlerhaften Positionen erhöhte

Reaktionszeiten und überproportional viele „erwartete Fehler“ (also hochautomatisierte sequentielle Nose Pokes in das Loch, das aufgrund des sequentiellen Ablaufs erwartungsgemäß hätte beleuchtet sein müssen). Die Kontrolltiere zeigten im Gegensatz keine erhöhten Reaktionszeiten an den fehlerhaften Positionen und zudem weniger „erwartete Fehler“ als die Kontrollgruppe.

Erstens stützen die Ergebnisse dieses Experiments die Annahme, dass dopaminerge Prozesse im dorsalen Striatum eine wichtige Rolle im sequentiellen Lernen spielen, zweitens konnte gezeigt werden, dass der verwendete SRTT sensitiv gegenüber subtotalen dopaminergen Läsionen in den Basalganglien ist.

5.2. STUDIE II: ACQUISITION AND PERFORMANCE IN A RAT SEQUENTIAL REACTION TIME TASK IS NOT AFFECTED BY SUBTOTAL VENTRAL STRIATAL 6-OHDA LESIONS

Um zu untersuchen, welchen Einfluss dopaminerge Prozesse im ventralen Striatum der Ratte auf sequentielles Lernen haben, wurden in diesem Experiment Tiere mit bilateralen 6-OHDA-Läsionen im ventralen Striatum im SRTT getestet. Der Ablauf des Experiments war abgesehen von dem Läsionsort derselbe wie in STUDIE I.

Die HPLC-EC-Analyse zeigte folgende dopaminerge Läsionseffekte: ventrales Striatum 58-60% Verlust, mediales dorsales Striatum 32-46% und laterales dorsales Striatum 7-16%. In den gemessenen Serotoninspiegeln fanden sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

In dem durchgeführten Katalepsietest zeigten sich keine generellen motorischen Defizite. In „activity box“-Testungen zeigten die Tiere ebenfalls die erwartete verringerte Reaktivität auf Amphetamin, von denen die Tiere sich aber im Verlauf des Experiments weitestgehend erholten (die Ergebnisse der „activity box“-Testungen sind nicht in der Publikation enthalten).

Die Läsionen hatten lediglich moderate Auswirkungen auf das sequentielle Lernen. Effekte auf die sequentielle Performanz waren nicht nachweisbar, da beide Gruppen sowohl im „S-R-S-R Test“ als auch im „Sequence Violation Test“ vergleichbare Interferenzeffekte bzw. ein ähnliches Ausmaß an „erwarteten Fehlern“ zeigten.

Da die Läsionseffekte in diesem Experiment subtotal waren, lässt sich allerdings nicht ausschließen, dass stärkere Läsionen einen Effekt auf das sequentielle Lernen gehabt hätten.

Anzumerken ist, dass das dorsale Striatum zumindest teilweise lädiert war. Die medialen dorsal striatalen dopaminergen Verluste lagen in STUDIE II jedoch unter 50%, in STUDIE I, in der eindeutige Effekte auf das Sequenzlernen gefunden wurden, hingegen bei 58-66%. Dies legt die Vermutung nahe, dass die dopaminergen Verluste im medialen dorsalen Striatum eine Schwelle von 50% überschritten haben müssen, damit sie Auswirkungen auf das sequentielle Lernen haben.

Der einzige signifikante Unterschied, der sich in den Verhaltenstests in dem Experiment zeigte, war die Dauer der Vorbereitungsphase [shaping]– also die Anzahl der shaping-Tage, bis die Tiere auf der FR 13 trainiert werden konnten.¹⁶ Dieses Ergebnis stützt die Annahme von Alcaro et al. (2007), dass die dopaminergen Prozesse im ventralen Striatum mit

¹⁶Zur Beschreibung des Shapings siehe Abschnitt 3.4.5 oder Anhang.

instrumentellen Konditionierungsvorgängen assoziiert sind. Deutlich wurde dies darüber hinaus an einem Tier mit besonders starken Läsionen im linken Striatum (sowohl dorsal als auch ventral über 90% Verlust), nicht aber im rechten Striatum (16-52% Verlust). Dieses Tier konnte trotz intensiven Shapings nicht das erforderliche FR 13 Kriterium erreichen. Dieser Fall deutet darauf hin, dass bereits massive dopaminerge striatale Läsionen in nur einer Hemisphäre ausreichen, um instrumentelles Lernen zu verhindern.

Zusammenfassend stützen STUDIE I und STUDIE II die Hypothese, dass dopaminerge Prozesse im dorsalen, nicht aber im ventralen Striatum eine kritische Rolle im sequentiellen Lernen spielen.

5.3. STUDIE III: DORSAL HIPPOCAMPAL LESIONS BOOST PERFORMANCE IN THE RAT SEQUENTIAL REACTION TIME TASK

In Studie III sollte der Einfluss hippocampaler Läsionen auf sequentielles Lernen im Ratten-SRTT untersucht werden. Die Läsionen wurden mit Ibotensäure gesetzt und beschränkten sich auf den dorsalen Teil des Hippocampus (Koordinaten nach Bast et al. 2009), da in unserer Studie Gedächtniseffekte im Mittelpunkt standen. Der dorsale Hippocampus wird mit kognitiven Funktionen assoziiert, der ventrale Hippocampus hingegen mit Stress und Emotionen (Fanselow & Dong 2010).

Die Läsionseffekte wurden mittels Kleintier-Magnetresonanztomographie (MRT) quantifiziert (angelehnt an Lee et al. 2009). In der Läsionsgruppe zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine hippocampale Volumenreduzierung von 45-47% (dorsale Läsionen, ventral erhaltenes Gewebe). scheinoperierte Tiere zeigten eine Volumenreduzierung von 4-6%.

In einem Test zum räumlichen Gedächtnis, dem Platz-Objekt Wiedererkennungstest [place-object-recognition test] (siehe Kart-Teke et al. 2006, Dere et al. 2006, Bevins & Besheer 2006, Good und Hale 2007), zeigten sich bei den lädierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe eine reduzierte Gedächtnisleistung sowie in der vorherigen Habituationsphase eine erhöhte motorische Aktivierung. Bei scheinoperierten Tieren zeigte sich wiedererwartend ebenfalls eine reduzierte räumliche Gedächtnisleistung.

Die SRTT-Testung folgte demselben Ablauf wie in STUDIE I und II, außer dass die Trainingsphase lediglich 15 Tage dauerte, da alle Gruppen nach dieser Zeit ein stabiles Leistungsniveau erreicht hatten.

In der Dauer der Shaping-Phase (die Anzahl der Tage, bis die Tiere das FR-13-Kriterium erreichten und die Trainingsphase begann, siehe Abschnitt 3.4.5) zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Allerdings machten die lädierten Tiere bereits am zweiten shaping-Tag mehr richtige Pokes als Kontrolltiere und scheinoperierte Tiere, wohingegen sich in der Anzahl der falschen Pokes keine Unterschiede zeigten.

Während der Trainingsphase zeigten die lädierten Tiere im Vergleich zu scheinoperierten und Kontrolltieren niedrigere Reaktionszeiten und eine niedrigere Fehlerrate. Im „S-R-S-R Test“ zeigten die lädierten Tiere ebenfalls eine überlegene Leistung in Reaktionszeiten und Fehlerrate, wobei sich bei allen Gruppen der erwartete Interferenzeffekt lediglich in der Fehlerrate zeigte. Im „Sequence Violation Test“ erhöhten sich sowohl bei der Kontrollgruppe als auch der Läsionsgruppe die Reaktionszeiten an den fehlerhaften Positionen. In der scheinoperierten Gruppe zeigten sich hingegen keine Reaktionszeitveränderungen an den fehlerhaf-

ten Positionen. Bei der Analyse der Fehlertypen zeigten sich lediglich bei den lädierten Tieren signifikant mehr „erwartete Fehler“ als zufällige Fehler.

Abschließend wurde noch ein Tests zur Erfassung der Fressrate [food consumption test] durchgeführt, da hippocampale Läsionen die Sensitivität gegenüber interozeptiven Hungersignalen erhöhen können (Davidson et al. 2010). Hier zeigten sich bei den lädierten Tieren jedoch in der Nahrungsaufnahme unter Nahrungsdeprivation keine Unterschiede zur Kontrollgruppe und scheinoperierten Tieren sowie eine verringerte Nahrungsaufnahme, wenn der Test ohne Nahrungsdeprivation durchgeführt wurde.

Zusammenfassend zeigte sich bei lädierten Tieren eine generell erhöhte Leistung im SRTT sowie eine höhere Automatisierung sequentiellen Verhaltens (angedeutet durch die Fehleranalyse im „Sequence Violation Test“) bei gleichzeitigen Defiziten im räumlichen Lernen. Offen bleibt hierbei die Frage, ob die hippocampalen Läsionen einen direkten Einfluss auf die Automatisierung sequentiellen Verhaltens hatten. Alternativ wäre auch ein indirekter Einfluss über verbessertes S-R-Lernen. Dadurch dass die lädierten Tiere in der Trainingsphase des SRTT generell schneller und akkurater arbeiteten, durchlief diese Gruppe pro Trainingstag öfter die Sequenz – was ein intensiveres sequentielles Training für die Läsionsgruppe zur Folge hatte.

Hippocampale Läsionen führen oft zu hyperaktivem Verhalten (Godsil et al. 2005), was sich in dem vorliegenden Experiment in der erhöhten Lokomotion während der Habituationsphase im Platz-Objekt-Wiedererkennungstest andeutet. Aufgrund der niedrigeren Reaktionszeiten bei gleichzeitig niedrigerer Fehlerrate kann die verbesserte Performanz der lädierten Tiere im SRTT jedoch nicht mit Hyperaktivität erklärt werden. Da sich zudem keine Unterschiede in der Fressrate zeigten, bzw. sogar eine reduzierte Fressrate bei den lädierten Tieren, ist es auch wenig wahrscheinlich, dass die Ergebnisse durch Unterschiede in der Sensitivität gegenüber dem Verstärker (den Futterpillen) erklärt werden können.

Die generellen Defizite der scheinoperierten Tiere sowohl im räumlichen Gedächtnis als auch in der SRTT-Leistung sind vermutlich auf die generelle Belastung durch die Operation zurückzuführen. Auch andere Studien berichten von signifikanten neurochemischen Veränderungen und mnestischen Defiziten in scheinoperierten Tieren (Adams et al. 1993, Hirshler et al. 2010, Grossman et al. 2003, Rao et al. 2000). Dies macht die überlegene Leistung der lädierten Tiere noch imposanter, da diese im Gegensatz zur Kontrollgruppe auch mit den Nebenwirkungen der Operation konfrontiert waren.

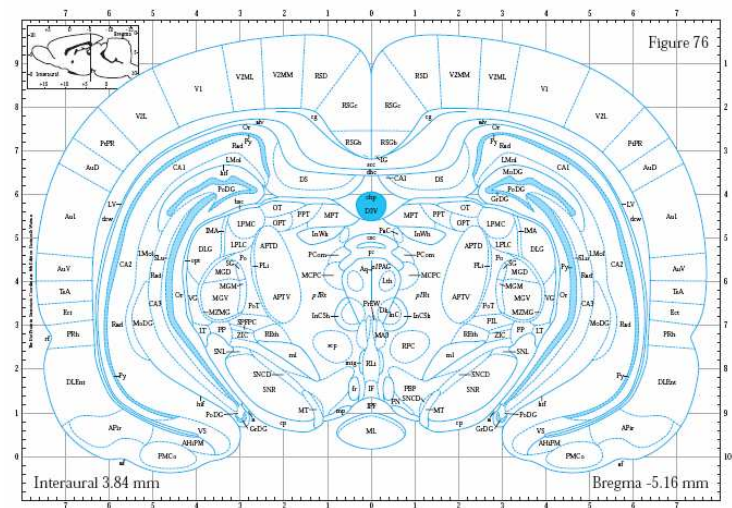
Diese Ergebnisse stützen die Hypothese von Kwock und Buckley 2009, dass der Hippocampus bei räumlichem und zeitlichem Lernen eine wichtige Rolle spielt, es hingegen bei

ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONEN

Tests, in denen räumliche oder zeitliche Aspekte irrelevant sind, zu Interferenzeffekten mit anderen Gedächtnissystemen kommen kann.

Nach Wirth et al. (1998) kommt es vor allem bei simplen assoziativen Lern- und Gedächtnisaufgaben zu einer Leistungsverbesserung bei hippocampalen Läsionen. Dieser Annahme widersprechen die Ergebnisse aus STUDIE III, da in dem angewendeten SRTT erstmals Leistungsvorteile bei hippocampal lädierten Tieren in einem sehr komplexen Test nachgewiesen werden konnten.

ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONEN



6. PUBLIKATIONEN

PUBLIKATIONEN

**STUDIE I: 6-HYDROXYDOPAMINE LESIONS IN THE RAT NEOSTRIATUM IMPAIR
SEQUENTIAL LERNING IN A SERIAL REACTION TIME TASK**

PUBLIKATIONEN

6-Hydroxydopamine Lesions in the Rat Neostriatum Impair Sequential Learning in a Serial Reaction Time Task

Moritz Thede Eckart · Moriah Christina Hulse-Matia ·
Rebecca S. McDonald · Rainer K.-W. Schwarting

Received: 18 May 2009 / Revised: 15 July 2009 / Accepted: 15 July 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract Sequential behavior has been intensively investigated in humans using so-called serial reaction time tasks (SRTT), in which visual stimuli are either presented in a random or sequential order. Typically, when the stimulus presentation follows a previously learned sequential order, reaction times are decreased compared to random stimulus presentation and become partly automated. A vast amount of SRTT findings indicates that sequential learning and performance seem to be mediated amongst others by the basal ganglia—especially the striatum—and the neurotransmitter dopamine therein. In this study we used an operant rat version of the human four choice SRTT to investigate the effect of bilateral neostriatal dopamine lesions induced by 6-hydroxydopamine on sequential learning. The rats' task was to respond rapidly to illuminated holes by nose-poking into them. During extensive training, the position of the illuminated hole followed a 12-item sequence. The outcome of this sequential training was also investigated in two tests, namely an interference test, where stimulus presentation switched between this sequential and a pseudo random order every five minutes, and a violation test, in which only one sequence item was eventually skipped. The neurotoxic lesions, which was placed before the start of training, led to the expected sub-total dopamine depletions (i.e. residual levels around 34–56% of controls), especially in the medial neostriatum. These lesions did not lead to general motor deficits in a catalepsy task, but moderate deficits in locomotion in an activity box, which largely recovered with time after lesion. In the SRTT, rats with

lesions showed impaired learning, that is, less response accuracy and slower reaction times than the control group. During a subsequent test with alternating phases of sequential and random stimulus presentations, reaction times and accuracy of the control group were superior during sequential as compared to random stimulus phases. In the lesion group, only a moderate advantage in accuracy was observed. In the violation test, another outcome measure, the control group showed an expected increase in reaction times on the violated positions. By contrast, the lesion group showed no such increase, which indicates less automation of sequential behavior in these animals. For one, these findings support previous evidence in showing that neostriatal dopamine plays an important role for instrumental behavior, in general. Furthermore, and most importantly, they suggest that dopaminergic-striatal networks also play an important role in sequential behavior, especially its acquisition.

Keywords Neurotoxic lesion · 6-OHDA · Dopamine · Dorsal striatum · Parkinson's disease

Abbreviations

6-OHDA	6-Hydroxydopamine
DA	Dopamine
FR	Fixed ratio
PD	Parkinson's disease
RT	Reaction time
SRTT	Serial reaction time task

M. T. Eckart (✉) · M. C. Hulse-Matia ·
R. S. McDonald · R. K.-W. Schwarting
Department of Psychology, Experimental and Physiological
Psychology, Philipps-University of Marburg, Gutenbergstraße
18, 35032 Marburg, Germany
e-mail: eckart@staff.uni-marburg.de

Introduction

In our study we examined the involvement of neostriatal dopamine (DA) in sequential learning and its outcome. The

critical test used here is a rodent serial reaction time task (SRTT). It was previously developed in our laboratory (Domenger and Schwarting 2005, 2007) to dispose a food-reinforced rodent SRTT model with high face validity to the classical human SRTT (first introduced by Nissen and Bullemer 1987). Analogous to the human SRTT, our rodent model is a four-choice task in which nose-poking into illuminated holes (visual stimuli) accords to key pressing. Similar to the human model, rats profit in terms of faster reaction time (RT) and higher accuracy when stimulus presentation follows a trained sequence compared to random stimulus presentation.

In humans, the SRTT has commonly been used to investigate the role of DAergic basal ganglia processes in sequential behavior since some clinical studies indicated that patients with Parkinson's disease (PD) showed impaired SRTT performance (e.g. Siegert et al. 2006), whereas other investigators have suggested that DA may not be involved in the processing of sequential learning (for discussions on these opposed findings, see Werheid et al. 2003; Badgaiyan et al. 2007; Vandenbossche et al. 2009). Nevertheless, models which propose the involvement of DAergic basal ganglia processes in sequential behavior are widely accepted (Graybiel 1998; Doyon and Ungerleider 2002; Doyon et al. 2002; Da Cunha et al. 2009; Schwarting 2009).

One common method to study the role of DAergic basal ganglia processes is bilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesions of the rat neostriatum, which is often used as an early phase PD model (Branchi et al. 2008). According to Packard and Knowlton (2002), this DAergic structure is crucial for sequential learning.

In a previous study, bilateral neostriatal 6-OHDA lesions were placed after the rats had been trained on the sequence. For one, the lesions led to a general instrumental impairment in terms of RT. Regarding sequential behavior, the animals with lesions conducted less automated responses and did not retain their superior sequential RT performance whereas they did in terms of accuracy. Furthermore, the lesions were not sufficient to completely abolish sequential behavior but the animals were not able to further improve their SRTT performance after surgery while controls did. This result hints at a role for neostriatal DA in learning as compared to established performance (Domenger and Schwarting 2008).

Based on these findings, the present study sought to investigate whether striatal DAergic processes are more relevant for the acquisition of a new sequence than for the performance of already learned ones. Therefore, we placed the lesions prior to sequential training. After such training, sequential performance was tested against that during randomly presented stimuli (S-R-S-R test). Also, and in a so-called sequence violation test, we assessed the degree of automation of sequential behavior, which, apart from

reaction times, can be tested by analyzing response profiles, i.e. proportions of correct responses and error types (for details, see Domenger and Schwarting 2007). In addition, lesion effects on general motor performance and locomotor activity were gauged by a catalepsy test and by tests in an activity box, respectively. Finally, the rats were sacrificed by decapitation and the striata were analyzed neurochemically by HPLC-EC.

Materials and Methods

Subjects

Thirty male Wistar rats (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Germany) weighing 250–274 g at the start of the experiment were used. They were kept in an animal room (temperature: 21–25°C; humidity: 31–47%) with a 12:12 h light/dark cycle (light on at 07.00 h) and were housed singly with ad libitum access to water. During the experimental phase, the animals received food only during (food pellets, see below) and directly after (Altromin rat chow, Altromin, Germany) daily instrumental sessions.

The instrumental training and testing periods took place between 9.00 and 16.00 h of the light phase. Before that, the rats were weighed daily (see also Table 1). In order to ensure that they maintained between 80 and 85% of their free feeding weight, they were fed individually weighted portions of Altromin chow according to their body weight and the number of pellets obtained during prior testing.

Table 1 Experimental schedule

Day	Events	
1	Arrival	
2–5	Handling	
6	Single housing	
7	Surgery	
8–13	Recovery	
14	Handling	
15	Activity box (1st test)	
16	Catalepsy test	Food deprivation
17–26 ^a	SRTT: Shaping	Food deprivation
27–46	SRTT: Training	Food deprivation
47	SRTT: S-R-S-R test	Food deprivation
48–49	SRTT: Training	Food deprivation
50	SRTT: Sequence violation test	Food deprivation
53	Activity box (2nd test)	
55	Decapitation	

^a Variable length

Surgery and Microinfusion

Surgery was performed under xylantine (Rompun[®], Bayer, 0.5 ml/kg) and ketamine (Ketavet[®], Pharmacia, 1 ml/kg) anaesthesia. Animals were fixed in a stereotactic apparatus. The lesion group ($n = 15$) received bilateral intracranial injections of 6-OHDA.HCl (Sigma Aldrich) into the striatum, with two injection sites per hemisphere. The coordinates were (from bregma): 0.5/1.6 mm anterior, $\pm 2.5/1.9$ mm lateral, and 5.0/4.5 mm ventral from dura (Paxinos and Watson 2005). One microliter of 6-OHDA solution was injected into each site using a Hamilton injection pump (Hamilton Co., USA) at a rate of 0.35 μ l/min. The toxin was dissolved in an ascorbate solution (0.1 mg/ml in 0.9% saline). The concentration was 16 μ g of 6-OHDA per μ l ascorbate solution (free base). The solution was prepared freshly each day, protected from light and kept on ice. After injections the needle was kept in place for 3 min, so that the solution could diffuse into the tissue. The control group comprised two sub groups: sham (same operation as the lesion group but only ascorbate solution was injected; $n = 8$) and non-operated animals (no surgery at all; $n = 7$). Otherwise, they were treated identically to the lesion group.

Experiments were conducted in accordance with the ethical regulations for animal experimentation at the University of Marburg. After surgery the animals were given 7 days for recovery before the behavioral tests started.

Catalepsy Test

Catalepsy was assessed by placing the rat's forepaws on a rectangular plastic block ($4.5 \times 14 \times 12.5$ cm) so that the hind paws remained on the floor. Then, the time until the animal changed its position by either descending from or climbing onto the block was recorded. Behavior was videotaped, and the data were analyzed offline by Adobe Premiere Pro CS3[®] film editing software (Adobe Systems, USA) at 25 frames per second. The catalepsy test was conducted on day before shaping was begun (see Table 1).

Activity Box

An activity box (acrylic, $40 \times 40 \times 40$ cm) monitored by an infrared automated activity monitoring system (Tru Scan[™], Photobeam Sensor-E63-22, Coulbourn Instruments, USA) was used, in which locomotion (distance traveled in cm) was recorded under red light (28 lux). Behavior was assessed twice: one day after the recovery phase that followed surgery, and one day after the sequence violation test (see Table 1).

In both tests, the animals were tested under three consecutive conditions: baseline (30 min), saline injection (1 ml/kg, i.p.; 30 min), and D-amphetamine (Sigma

Aldrich, D-amphetamine sulfate) injection (1.5 mg/kg, i.p.; 60 min) with 5 min breaks in between.

SRT Task

Operant Chambers

Four modified operant chambers were used, which were placed in separate sound-attenuated cubicles (see also Domenger and Schwarting 2007). In each chamber, four light-equipped nose-poke holes (2 cm in diameter, 1 cm deep) were arranged in a small alcove in a semi-elliptic way tilted toward the receptacle. The four holes were numbered as follows: [1] upper left, [2] upper right, [3] bottom left, [4] bottom right. The pellet receptacle was connected to a dispenser, which delivered the amount of pellets (dustless precision pellets, 45 mg each, Bioserve, Bilaney Consultants, Germany) in an adjustable way. Infrared devices detected entries into the nosepoke holes and the receptacle. The entire operant chamber system was controlled, monitored, and registered by Med-PC[®] software (Med Associates, USA).

General Procedure

The rats had to respond by quickly poking their nose into the currently illuminated hole (termed "correct poke"). They were shaped and trained to respond to series of such illuminated holes before being reinforced; that is, at the final level they were reinforced by food-reward (dustless precision pellets, see above) on a fixed ratio schedule of 13 (FR13, see below).

Shaping

Three days prior to shaping, food deprivation started, and the animals were held at 80–85% of their free feeding weight until the end of the operant testing phase.

From the first day of shaping until the first testing day (see below), the rats were trained for 20 min per day. Initially, one hole was illuminated, and poking into it was reinforced on a continuous schedule. Poking into a non-illuminated hole was not reinforced but turned on the house-light and the speaker (75 dB) for 2 s, termed "break time". When the rat had learned to respond in order to get food, a different hole was illuminated, and the procedure was repeated until each of the four holes had been visited. Then, the rat was shaped to respond to any of the holes illuminated in a random fashion. Finally, it was shaped to respond to an increasing ratio (FR) until FR 13 under sequential conditions was reached (see below). In parallel, the number of pellets per reward was progressively increased, so that the rat finally received four pellets when

completing the series. Furthermore, an increasingly strict time limit (from 60 to 5 s) between consecutive responses was introduced to force the rats to respond quickly, meaning that if the rat did not poke within 5 s, a break-time occurred. Such events were termed “omissions”. The current hole remained illuminated until the time limit expired or until the rat poked correctly. After wrong pokes or omissions, stimulus presentation continued from that item, where it had been interrupted. During the break-time, the current hole was not illuminated. After reward delivery (i.e. after a correct poke on Position 13 of the FR), rats were given a maximum of 60 s (instead of 5 s) to eat the pellets until responding to the next stimulus.

Training

After shaping, the rats were trained on the sequence (see below) for 20 min per day until the lesion group showed a stable level of performance over three consecutive days (i.e. no significant within-group differences in a repeated measurement ANOVA). This criterion was reached after 19 days of training.

S-R-S-R Test

After the training period (see Table 1), the operant chambers were run on a program that switched between sequential and pseudo random (see below) stimulus presentation every five minutes (sequential stimuli presentation: min 1–5 (seq₁) and 10–15 (seq₂), random stimulus presentation: min 5–10 (rand₁) and 15–20 (rand₂)).

Sequential conditions (S): Here, the holes were illuminated in a predetermined order of 12 locations (the same sequence, as follows, had also been used in the training period: 3-2-4-1-3-4-2-1-2-3-1-4). This sequence was continuously repeated. We designed a 12-item sequence so that all possible transitions from one hole to another were represented in the sequential condition, ensuring that general response requirements were identical to the random condition. This so-called 2nd order conditional sequence was constructed according to the requirements as postulated by Reed and Johnson (1994). Since this 12-item sequence was run on a FR 13 schedule, dissociation between sequence and FR schedule was provided, which prevented the rats from associating temporal positions during the FR schedule steps with spatial positions (sequence items). This procedure ensured that a specific sequence item could not be associated with the reward delivery (for details see Domenger and Schwarting 2005, 2006). *Random conditions (R):* Here the holes were illuminated in a pseudo-random fashion, since a given hole was never illuminated two times in a row (e.g. 1-3-3-2), as described in the human task (Nissen and Bullmer 1987).

In the S-R-S-R test, the rats also had a time limit of 5 s to poke into the active hole, but, in contrast to the training session, the active hole was illuminated for only 1 s.

Sequence Violation Test

After the S-R-S-R test, the animals were again run on the sequential training program for 20 min per day for 2 days and then they were tested on the sequence violation program (see Table 1). In this program, the stimuli were presented in the familiar sequential order throughout the first 5 min. Then, the program shifted between sequences that were either violated at their 9th FR position (namely by skipping one item in the 12-item sequence), or that were normal (i.e., identical to previous sequential training and testing). This shifting assured an equal number of violated and not violated sequences.

Neurochemistry

Transmitter depletion was analyzed post-mortem using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-EC, Antec Leyden BV, The Netherlands).

One day after the last activity test, the rats were decapitated under deep anaesthesia (pentobarbital-sodium, Narcoren[®], Merial, Germany, 2.5 ml/kg) and the brains were immediately removed. Two-millimeter-thick slices (approximately between 0.0 and 2.0 mm anterior of Bregma) were cut out of the brains. The striata of both hemispheres were extracted separately and divided into three parts: lateral and medial neostriatum, and ventral striatum. Probes were homogenized in 0.05 M perchloric acid, and stored at –80°C. The samples were analyzed for their contents of dopamine (DA), dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and serotonin (5-HT). The biogenic amines were separated on a Nucleosil 100-5 C18 column (125 × 4 mm, particle size 5 µm, Macherey-Nagel, Germany) using a mobile phase containing 35 ml/l acetonitrile, 140 ml/l octanesulphonic acid, 100 mg/ml Na₂EDTA, and 6 ml/l triethylamine.

Data Analysis

All analyses were performed by SPSS 14.0. Since there were no differences (neither in behavioral nor neurochemical data) between sham-operated and non-operated animals, their data were pooled. All results, which are expressed as means ± SEM, were tested for normal distribution by Kolmogorov–Smirnov tests. For data that did not significantly differ from the normal distribution ($P > 0.05$), either *t*-tests or analyses of variance (ANOVA) were performed. When indicated by an ANOVA, post-hoc tests were performed with Sidak corrections for multiple comparisons (Abdi 2007).

Non-normal distributed data were analyzed by nonparametric tests (Wilcoxon or *U*-tests). The level of statistical significance was set at $P < 0.05$. If not else wise noted, all *P*-values were conducted two-tailed, and only those tests related to a priori hypotheses were one-tailed.

Results

Neurochemistry

In the lesion group, DA was significantly reduced in both hemispheres in the medial and lateral neostriatum as compared to controls (see Table 2): medial right: $t_{28} = -3.808$; $P \leq 0.001$; medial left: $t_{27} = -5.677$; $P \leq 0.001$; lateral right: $t_{28} = -3.813$; $P \leq 0.001$; lateral left: $t_{27} = -4.765$; $P \leq 0.001$. The lesions were most pronounced in the medial neostriatum, where residual DA levels ranged around 34–42% as compared to 53–56% to the lateral part. In the ventral striatum, mean residual DA levels ranged around 74–77% but did differ significantly from controls (right: $t_{26} = -1.607$; $P = 0.120$; left: $t_{26} = -1.452$; $P = 0.158$).

The 5-HT analyses did not reveal significant differences between lesion and control group for any of the extracted structures (data not shown).

Catalepsy Test

The time elapsed until body position was changed did not differ between the lesion (5.37 ± 1.78 s) and the control group (5.31 ± 2.06 s; $t_{28} = 0.023$; $P = 0.982$).

Activity Box

The distances traveled during the different activity box sessions (baseline, saline, amphetamine) were analyzed by separate ANOVAs for repeated measures with groups (lesioned versus control) and time intervals (5 min each) as factors.

The first activity box session (Fig. 1a) revealed the following results: During the baseline test, activity declined during the test ($F_{5;26} = 95.619$; $P < 0.001$) and was higher in the control group ($F_{1;27} = 14.033$; $P = 0.001$). Post-hoc

Sidak tests revealed more activity in the control group (*P*-values between 0.001 and 0.018) for all time intervals except the initial 5 min. There was no significant interaction between groups and time ($F_{5;26} = 1.397$; $P = 0.229$). During the subsequent saline test, activity again declined ($F_{5;26} = 27.763$; $P < 0.001$), but there were no longer group differences ($F_{1;27} = 0.502$; $P = 0.485$), nor significant interactions ($F_{5;26} = 1.718$; $P = 0.134$). During the final amphetamine test, activity increased ($F_{11;26} = 12.272$; $P < 0.001$) and was higher in the control group ($F_{1;27} = 4.491$; $P = 0.043$). Also, there was a significant interaction between group and time ($F_{11;26} = 2.301$; $P = 0.010$), and the post-hoc tests revealed more activity in the control group (*P*-values between 0.010 and 0.045) during time intervals between 40 and 60 min.

The second activity box session (Fig. 1b) revealed the following results: During the baseline and the saline test activity declined (baseline: $F_{5;26} = 50.604$; $P < 0.001$, saline: $F_{5;26} = 30.077$; $P < 0.001$). Except for these, there were no other significant effects in the two tests (all *P*-values > 0.05). During the final amphetamine test activity declined ($F_{11;26} = 8.720$; $P < 0.001$), but did not differ between groups ($F_{1;27} = 0.088$; $P = 0.769$). There was a significant interaction between groups and time ($F_{11;26} = 3.481$; $P < 0.001$). The post-hoc tests revealed higher activity during min 11–15 in the lesion group ($P = 0.026$).

SRT-Task

Training

During the 19-day training period, that is, when all rats worked under the 12-item sequential condition and an FR13, RTs of the correct pokes decreased over days and ran asymptotically toward the abscissa in the control group. This profile was clearly less pronounced in the lesion group, but both groups increased their performance. Thus, in the lesion group the mean RT on day 1 was 1.32 ± 0.05 s as compared to 0.87 ± 0.05 s (day 1 vs. 19: $t_{14} = 17.221$; $P < 0.001$), and in the control group the mean RT on day 1 was 1.32 ± 0.07 s as compared to 0.70 ± 0.03 s on day 19 ($t_{14} = 10.548$; $P < 0.001$).

Table 2 Neurochemical results

	ng DA/mg tissue control	ng DA/mg tissue lesion	Residual DA: % of controls
Neostriatum medial right	8.49 ± 0.96	3.54 ± 0.88	41.73
Neostriatum medial left	8.03 ± 0.85	2.70 ± 0.44	33.61
Neostriatum lateral right	10.52 ± 0.86	5.84 ± 0.86	55.54
Neostriatum lateral left	10.62 ± 0.73	5.63 ± 0.75	52.97
Ventral striatum right	2.11 ± 0.25	1.56 ± 0.23	73.79
Ventral striatum left	2.25 ± 0.28	1.74 ± 0.20	77.49

Values reflect means \pm SEM. In addition (right column), residual DA levels in the lesion group are calculated as percentage of controls

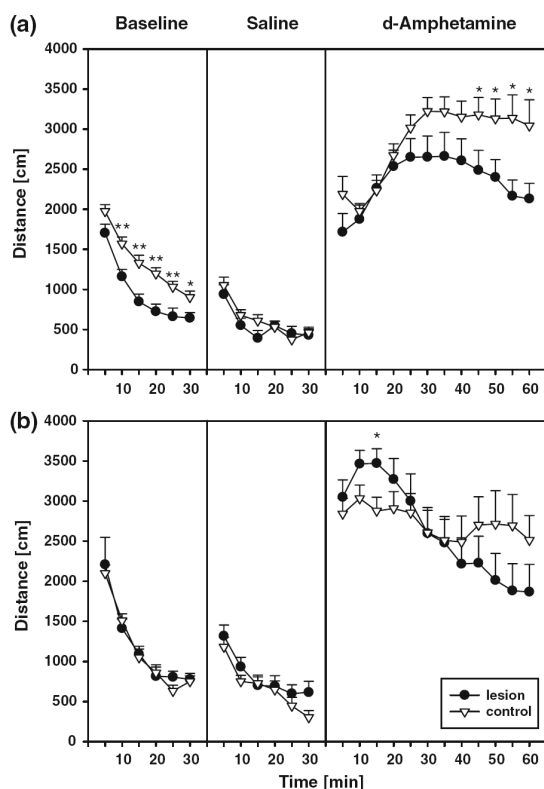


Fig. 1 Locomotor activity (distance traveled in cm) in an automated activity box during three consecutive tests, expressed in blocks of 5 min each. During the first block (left parts of each graph), the rats were tested for 30 min without any treatment. Then (middle parts), they were tested for another 30 min after an s.c. injection of saline. Finally (right parts), they were tested for 60 min after an i.p. injection of d-amphetamine (1.5 mg/kg). Filled symbols (means \pm SEM) reflect animals with 6-OHDA and open symbols reflect controls. **a** (top) The data from the first test phase performed 15 days after lesion; **b** re-test data obtained at 53 days. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ denote differences between groups during a given time period

An ANOVA for repeated measures with groups and training days as factors revealed a significant decline of RTs over days ($F_{6.5;176.5} = 96.219$; $P < 0.001$), faster RTs in the control group ($F_{1;27} = 4.666$; $P = 0.040$), but no significant interaction ($F_{6.5;176.5} = 2.086$; $P = 0.052$). Post-hoc Sidak tests were calculated to test for group differences on single days. No differences were found until day 7 and on days 10 and 13, whereas all other training days revealed faster RTs in the control group (see Fig. 2; P -values between 0.012 and 0.039).

Response accuracy (% of correct pokes) also increased with training in both groups. In the lesion group, the mean accuracy on day 1 was $64.66 \pm 2.78\%$ as compared to $73.11 \pm 2.43\%$ on day 19 ($t_{14} = -3.499$; $P = 0.004$), and in the control group accuracy on day 1 was $74.04 \pm 1.36\%$

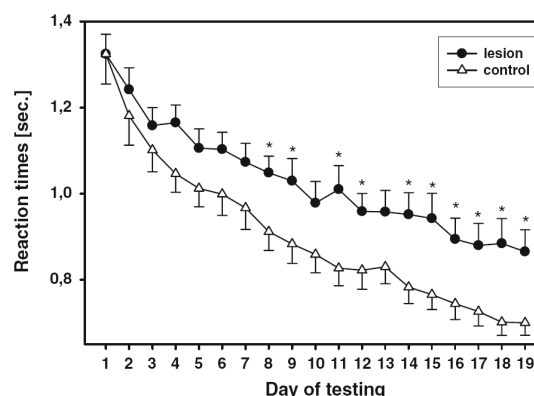


Fig. 2 Reaction times (in s; means \pm SEM) during the 19-day period of sequential training. Each data point reflects the mean of a given daily 20 min period. Filled symbols reflect animals with 6-OHDA and open symbols reflect controls. * $P \leq 0.05$ denote differences between groups on a given test day

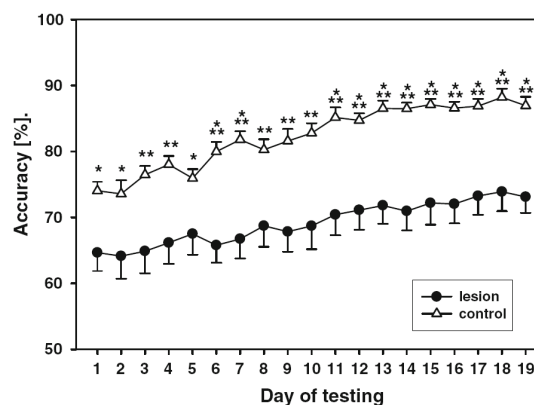


Fig. 3 Response accuracy (in %; means \pm SEM) during the 19-day period of sequential training. Each data point reflects the mean of a given daily 20 min period. Filled symbols reflect animals with 6-OHDA and open symbols reflect controls. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ denote differences between groups on a given test day

as compared to $86.94 \pm 1.33\%$ on day 19 ($t_{14} = -10.179$; $P < 0.001$).

The ANOVA (same factors as RT, see above) also revealed a significant increase in accuracy over days ($F_{5.5;147.6} = 20.947$; $P < 0.001$) and higher values in the control group ($F_{1;27} = 18.712$; $P < 0.001$), but no significant interaction ($F_{5.5;147.6} = 1.637$; $P = 0.148$). Post-hoc tests revealed that the two groups differed on each day of testing (Fig. 3; P -values between <0.001 and 0.030).

S-R-S-R Test

In this test, sequential and random conditions were tested in consecutive 5 min periods. Over these alternating test

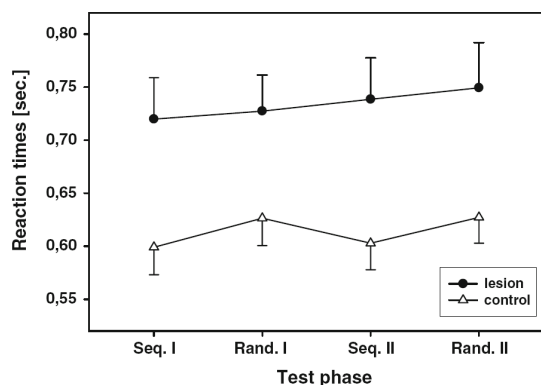


Fig. 4 Reaction times (in s; means \pm SEM) during consecutive 5-min blocks during which stimulus presentation followed either the previously trained sequential order (seq. I, seq. II) or a random order (rand. I, rand. II). Filled symbols reflect animals with 6-OHDA and open symbols reflect controls

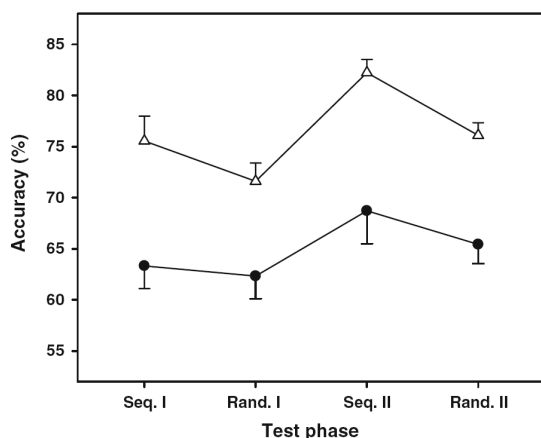


Fig. 5 Response accuracy (in %; means \pm SEM) during consecutive 5-min blocks during which stimulus presentation followed either the previously trained sequential order (seq. I, seq. II) or a random order (rand. I, rand. II). Filled symbols reflect animals with 6-OHDA and open symbols reflect controls

conditions, RTs (Fig. 4) and accuracy (Fig. 5) of controls formed a “saw-tooth shape”, which means that RTs were faster during sequential stimulus presentation and slower during random stimulus presentation (for accuracy vice versa). These typical shapes could not be observed in the lesion group.

Reaction Time (Fig. 4)

For this variable, reaction times of all correct pokes, excluding those on position 1 of the FR, were included into the analyses. Initially, it was tested whether the RT measured

in seq₁ differed from seq₂ and if the RT of rand₁ differed from rand₂ (data not shown). Since no significant differences were found within conditions, their data were pooled and analyzed using a 2×2 ANOVA (group: 6-OHDA vs. control \times condition: sequence vs. random) with repeated measurement on the second factor. The ANOVA revealed a significant group effect ($F_{1,28} = 7.955$; $P = 0.009$) and a significant repeated measurement effect ($F_{3,26} = 4.708$; $P = 0.039$). The interaction was not significant ($F_{3,26} = 1.069$; $P = 0.310$).

Although there was no significant interaction, *t*-tests for the repeated measurement effects were performed separately for each group to test the a priori hypotheses. The underlying rationale is that the overall *F*-value does not seem to be required in order to conduct multiple comparisons where appropriate *t*-tests are conducted (Wilcox 1987; Howell 2002).

For the control group, the *t*-test revealed faster RTs during the sequential as compared to the random condition ($t_{14} = -2.708$, $P = 0.0085$; one-tailed), whereas there was no such difference in the lesion group ($t_{14} = -0.704$; $P = 0.2465$; one-tailed).

Accuracy (Fig. 5)

Here, the proportion of correct to incorrect pokes was calculated. All pokes into non-illuminated holes, excluding those during break time and double pokes (two pokes into the same hole within 1 s), were termed “incorrect pokes”. All pokes into the illuminated (i.e., active) hole within the 5 s time limit were termed “correct pokes”.

Due to significant differences between the sequential conditions in the lesion group and between the sequential as well as random conditions in the control group (data not shown), the accuracy data—in contrast to the reaction time data—could not be pooled.

The data were analyzed using a 2×4 ANOVA (group: 6-OHDA vs. control \times condition: seq₁ vs. rand₁ vs. seq₂ vs. rand₂) with repeated measure on the second factor. The ANOVA yielded a significant group effect ($F_{1,28} = 3210.293$; $P \leq 0.0001$) and a significant repeated measurement effect ($F_{3,26} = 9.690$; $P = 0.004$). The interaction was not significant ($F_{3,26} = 0.003$; $P = 0.957$), meaning that the control group reached higher accuracy values than the lesion group, and that in both groups, accuracy was higher during the sequential condition.

Again, *t*-tests were performed separately to test the a priori hypotheses. In the lesion group, there was no difference between accuracy during seq₁ and rand₁ ($t_{14} = 0.513$; $P = 0.616$), an increase from rand₁ to seq₂ ($t_{14} = -2.801$; $P = 0.014$) and no difference between seq₂ and rand₂ ($t_{14} = 1.280$; $P = 0.221$). In the control group, there was a decrease in accuracy from seq₁ to rand₁ ($t_{14} = 2.217$;

$P = 0.044$), an increase from rand_1 to seq_2 ($t_{14} = -6.342$; $P \leq 0.001$), and a decrease from seq_2 to rand_2 ($t_{14} = 4.186$; $P \leq 0.001$, all tests one tailed).

Omissions

In general, response omissions occurred rather seldom (in most cases less than 10 responses per animal in the S-R-S-R test). Furthermore, the amount of omissions did not differ between sequential and random stimulus presentation (neither in the lesion nor in the control group). Therefore, the measure of omissions was not considered further in our analyses.

Sequence Violation Test

Reaction Times

As in the S-R-S-R test, only correct pokes were considered in this analysis. The aim was to compare mean RTs to the violated sequences with those of the non-violated sequence. In order to demonstrate this difference we compared (a) the mean RT on position 8 and 9 within both sequences and (b) the RT on position 9 of the FR in the violated sequences with that of the non-violated sequences. Furthermore, we assessed the changes in RT from position 8 to 9 within conditions. Since we tested *a priori* hypotheses, all tests are presented one-tailed.

The control group had higher mean RTs to position 9 in the violated condition than to the same position during the non-violated condition ($t = 5.04$; $df = 14$; $P \leq 0.001$; see Fig. 6a). Also, the RTs to the violated position 9 were higher than those to the preceding non-violated position 8 ($t_{14} = 3.48$; $P = 0.004$), as compared to a decrease between position 8 and 9 in the non-violated condition ($t_{14} = -2.45$; $P = 0.028$). In the lesion group, there were no such effects, that is, no significant difference in RT on the 9th position between the violated and the non-violated condition ($t_{14} = 1.53$; $P = 0.15$; see Fig. 6b), and no significant increase in RT from position 8 to 9 in the violated condition ($t_{14} = 1.57$; $P = 0.12$).

Response Types (Fig. 7)

Additionally, we analyzed the types of pokes made at the 9th position of the violated sequences. These were termed as “correct pokes”, when the animals poked into the illuminated hole, “expected errors”, if the animals poked into the hole that was skipped due to the violation, and “random errors”, if the rats poked into any other hole.

An ANOVA with groups (lesion vs. control) and poke types as repeated measurement factor (correct pokes, expected errors, random errors) revealed no significant

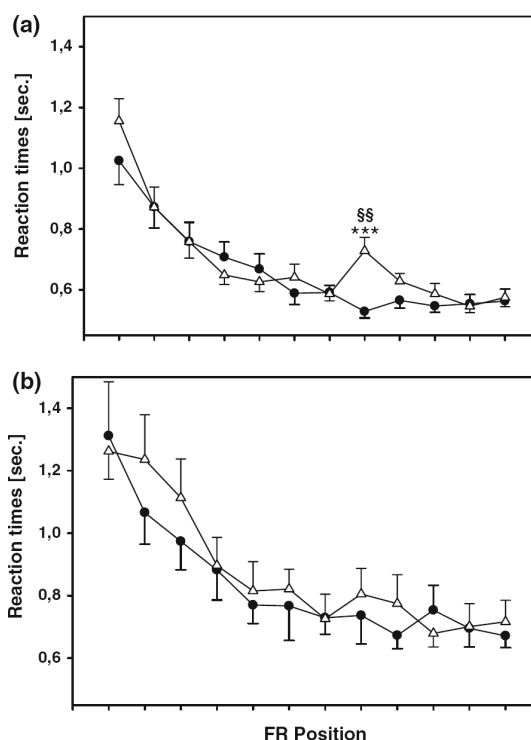


Fig. 6 Serial patterns of regular and violated sequences shown by the control (a) and the lesion group (b). The violation occurred at position 9 of the FR schedule in randomly chosen sequences. Note that the 1st response after food delivery is not shown, since its duration is flawed by previous food pellet consumption. §§ $P \leq 0.01$ versus the preceding non-violated position 8; *** $P \leq 0.001$ as compared to position 9 of non-violated sequences

group effect ($F_{1,28} = 1.881$; $P = 0.181$), a significant repeated measurement effect ($F_{2,26} = 30.295$; $P < 0.001$), and a significant interaction ($F_{2,26} = 3.561$; $P = 0.035$).

Post-hoc Sidak tests revealed that the control group made significantly more correct pokes than expected ($P = 0.006$) or random errors ($P < 0.001$). Furthermore, they made more expected than random errors ($P = 0.003$). The lesion group also made more correct responses than random errors ($P = 0.001$) but not than expected errors ($P = 0.236$). Between-group comparisons showed that the control group made more correct pokes ($P = 0.029$) and less random errors ($P = 0.048$) than the lesion group, whereas the number of expected errors did not differ between them ($P = 0.565$).

Discussion

We tested the effects of neostriatal DA lesions in an instrumental SRTT model in which rats have to perform

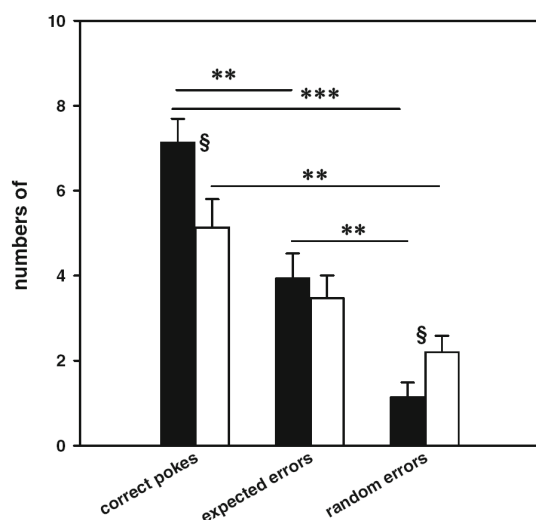


Fig. 7 Response types of the lesion and the control group at the position of the violation. “Correct” pokes are those where the rat poked into that hole which was actually lit. “Expected” errors are pokes into that hole which should have been lit if the sequence had not been violated. “Random” errors are pokes into one of the two remaining unlit holes. ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ refer to differences of response types within groups; \$ $P \leq 0.05$ refers to differences between groups

serial choices on an FR13 schedule in order to obtain food reinforcement. The lesions were placed before the instrumental task so that we could test task acquisition and also its outcomes using a so-called S-R-S-R test and a violation test. Based on our previous experiment (Domenger and Schwarting 2008), we expected that sequential learning should be impaired in the lesion group. Furthermore, we hypothesized that the lesion group should not show an interference effect in the S-R-S-R test, that is increased RTs and decreased accuracy, which are observed in intact animals during phases of random stimulus presentations as compared to phases with well-trained 12-item sequences (Domenger and Schwarting 2005, 2006). In the violation test, intact rats typically show an increase in their RTs on the violated position and a higher probability of poking into the expected hole (i.e. the hole that would have been activated according to the sequential order but was actually skipped) as compared to random errors (Domenger and Schwarting 2006). Here, pokes into the expected hole are regarded as indices of automated behavior, that is, behavior guided by the internalized sequence rather than the actual stimuli. Our hypothesis for this test was that performance of the lesion group should be less affected by the violation since their impaired sequential learning should also result in less automation (for details, see Domenger and Schwarting 2007, 2008). Besides these instrumental tests, we also

measured catalepsy and locomotor activity to test for general lesion effects, which might have accounted for deficits in our SRTT task.

DA Depletion

The HPLC-EC analysis revealed a significant but subtotal neostriatal DAergic loss in the lesion group. This depletion was most pronounced in the medial part of the neostriatum. In the ventral striatum the amount of DA did not differ between groups. The analyses were conducted separately for both hemispheres, but there were no noteworthy differences between hemispheres in any of the structures analyzed here. The amount of 5-HT was not affected in any of the analyzed structures. In summary, the lesion group had an incomplete but significant selective DAergic loss in the dorsal striatum of both hemispheres. This degree of 6-OHDA-induced neostriatal DA loss is comparable to that of several previous studies (Domenger and Schwarting 2008; Courtiere et al. 2005; Robbins et al. 1990; Lindner et al. 1997; Amalric et al. 1995).

Catalepsy Test/Activity Box

The catalepsy test was conducted to test for general motor impairments (Sandberg et al. 1988; Jinnah and Hess 2003), and the present data do not provide evidence for such effects in the lesion group. These results are in line with the assumption that subtotal DA lesions spare gross motor function (Kirik et al. 1998; Ferro et al. 2005).

In contrast, tests in the activity box yielded effects since the lesion group showed a reduction of undrugged locomotor activity. This decrease was observed during the first baseline test (i.e. 2 weeks after lesion placement), but not in the subsequent saline test, nor in the re-tests performed 38 days later. Presumably, the lesion led to a moderate and transient locomotor deficit, especially when tested in response to a novel environment and when tested early after lesion. During the drug challenge with the psychomotor stimulant, the lesion group showed less drug-induced activation early after lesion. Similar results have also been observed before (Antoniou et al. 1998; Cass et al. 2005), and it is assumed that the blunted response in the lesion group reflects the reduced capacity of residual striatal DA neurons, which is otherwise required for the effects of this indirect DAergic agonist. In the second activity box session, performed weeks later, the lesion and control group no longer differed in terms of the total distance traveled during amphetamine challenge. This finding might indicate functional recovery during the time interval between the two tests (Scholtissen et al. 2006). Interestingly, these processes might not have fully normalized function, since the temporal profiles of the two groups were still not identical. Thus, the

lesion group transiently now showed more activity than the control group during the initial phase of AMPH action. The reason for this enhancement is not clear. One may speculate that it was due to compensatory mechanisms, like enhanced drug-induced release of DA from residual neurons or stimulation of supersensitive DA receptors. Apparently, these effects were wearing out rapidly since they were only temporarily effective.

Sequential Training

Training

The RTs of the daily sequential training sessions formed a typical learning curve that ran asymptotically toward the abscissa until the groups reached rather stable levels of performance. Initially, that is during the early phase of training which followed basic instrumental shaping, RTs of the lesion group did not differ from controls, whereas in the subsequent course, the lesion group showed a lower learning gradient than the controls. Although the lesion group was impaired in its sequential training as compared to controls, it still improved its performance in terms of RT and accuracy. This indicates that the lesion group was not impaired in the basic acquisition of the instrumental task but in the extent of enhancement by daily training, which might be due to an impairment in further instrumental learning or speeding, and/or an inability to profit from the sequential succession of stimulus presentation.

S-R-S-R Test

As can be seen when comparing Figs. 2 and 4, RTs in the S-R-S-R test were lower than the RT of the last training days. This effect has also been observed in previous experiments (unpublished data) and is due to the shortened stimulus presentation during the S-R-S-R test which forces the animals to react faster.

The data of the control group showed the expected interference effect, i.e. higher RTs during random conditions and an opposite pattern in the accuracy data. By contrast, there was no such interference effect in the lesion group, but a constant RT increase throughout the 20 min testing session. In the accuracy data, the interference effect was still observed, though not as prominent as in controls. There was a significant increase in accuracy from rand_1 to seq_2 , while there were no significant changes from seq_1 to rand_1 and from seq_2 to rand_2 .

Sequence Violation Test

During the non-violated sequences, both groups showed a typical ratio run, as the RT decreased constantly from the

first poke in the FR until reward delivery. During the violated sequences, the ratio run of controls was interrupted at the violated 9th position, leading to a significant RT increase from the 8th to the 9th position. A comparison of the 9th position of the violated sequences and that of the non-violated sequences also revealed a significant difference in terms of a higher RT at the violated 9th position. In the lesion group, the RTs did not increase from the 8th to the 9th position during the violated sequences nor did this group show enhanced RT at the violated 9th position as compared to the same position of non-violated sequences.

Besides reaction times, the profile of response types to the violated position also differed between groups. A detailed analysis revealed that controls made more (a) correct pokes than errors and (b) more expected errors than random errors. This shows that these animals responded correctly in most cases. If they made an error, they had a high tendency to poke into that hole which was skipped by the sequence violation. This outcome indicates that sequential behavior was both, mainly stimulus guided, i.e. by the illumination of the nose poke holes, but partly also automated, that is, automated habit like responses into the expected hole, which were probably guided by the internalized sequence (for habit formation and the role of the striatum, see Yin et al. 2004; Faure et al. 2005). Within the lesion group, the only significant difference was observed between correct pokes and random errors. The lesion-dependent lack of a significant difference between expected errors and random errors indicates that the tendency to poke into the expected hole was even less pronounced than in controls. Also, the significantly lower number of correct pokes of the lesion group indicates generally poorer performance, which is further substantiated by the significantly higher number of random mistakes than in controls (see also Domenger and Schwarting 2007).

Taken together, the 6-OHDA lesion had a clear effect on instrumental behavior, in general, and on sequential learning and performance, in specific. This means that the neostriatal DA loss impaired the ability for sequential learning but did not totally prevent it. Also, the lesions had stronger effects on RTs than on accuracy. However, a total prevention of sequential learning was not expected, because striatal DA levels had been reduced only partially by the lesions and were not totally depleted. Such total lesions would not be feasible in our test since they should lead to severe collapses of general instrumental performance.

It should also be noted that the observed differences between control and lesion group in the S-R-S-R test and the sequence violation test were chronologically very close to the second activity box session. In contrast to the S-R-S-R and sequence violation test and the first activity box session, the second activity box session no longer revealed significant

lesion effects in undrugged locomotor behavior. This indicates that the SRTT is more sensitive to DAergic lesions in the striatum—even after a long recovery phase—than a conventional locomotor test in an activity box.

The results of the S-R-S-R test and the sequence violation test are in line with a recent model by Packard and Knowlton (2002 SRTT 23) who propose the neostriatum—especially the medial part—to be crucial for the S-R components of sequential learning. Also, the assumption that striatal DAergic processes are crucial for the acquisition of a new sequence and not for the performance of an already learned sequence is confirmed by our results.

A computational model that provides an explanation for the striatal DAergic involvement in sequential learning but not performance is given by Ashby et al. (2007). This model proposes the activation of a slower “visual cortex–dorsal striatum–premotor cortex” path during procedural learning (sequential learning is a subcategory of procedural learning). With intensive training the control of behavior is gradually passed to a faster direct cortical–cortical pathway. This would imply that the more trained a task is, the less the striatum is involved and the faster the RT becomes. This model gives an explanation why DAergic lesions in the neostriatum have a severe effect on sequential performance when they are set before the training phase (like in the present study) as compared to lesions that are set thereafter. In the early phase of training, the integrity of the striatum is crucial for sequential learning. When the sequential behavior is already well trained, the striatum is no longer or at least to a smaller extent involved in sequential performance (like in the study of Domenger and Schwarting 2008).

The results of this study also provide a further validation of our rat 4-choice SRTT. The task has proven to be sensitive to pharmacological DA manipulations (Domenger and Schwarting 2006) and to DAergic basal ganglia lesions. Thus, it provides a novel tool in rodent research to study sequential learning, capability, and their neural substrates (for review, see Schwarting 2009). Compared to other rodent tests for sequential behavior, the main advantage of this SRTT model is its high face validity to the classic human task.

Acknowledgments This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Schw 559/6-1). Moritz Thede Eckart is a member of the DFG graduate program “NeuroAct”.

References

- Abdi H (2007) Bonferroni and Sidak corrections for multiple comparisons. In: Salkind NJ (ed) Encyclopedia of measurement and statistics. Sage, Thousand Oaks, CA
- Amalric M, Moukhles H, Nieoullon A, Daszuta A (1995) Complex deficits on reaction time performance following bilateral intrastriatal 6-OHDA infusion in the rat. *Eur J Neurosci* 7:972–980
- Antoniou K, Papadopoulou-Daifotis Z, Kafetzopoulos E (1998) Differential alterations in basal and D-amphetamine-induced behavioural pattern following 6-OHDA or ibotenic acid lesions into the dorsal striatum. *Behav Brain Res* 97:13–28
- Ashby FG, Ennis JM, Spiering BJ (2007) A neurobiological theory of automaticity in perceptual categorization. *Psychol Rev* 114: 632–656
- Badgaiyan RD, Fischman AJ, Alpert NM (2007) Striatal dopamine release in sequential learning. *Neuroimage* 38:549–556
- Branchi I, D’Andrea I, Armida M, Cassano T, Pezzola A, Potenza RL, Morgese MG, Popoli P, Allea E (2008) Nonmotor symptoms in Parkinson’s disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. *J Neurosci Res* 86:2050–2061
- Cass WA, Peters LE, Smith MP (2005) Reductions in spontaneous locomotor activity in aged male, but not female, rats in a model of early Parkinson’s disease. *Brain Res* 1034:153–161
- Courtiere A, Hardouin J, Locatelli V, Turle-Lorenzo N, Amalric M, Vidal F, Hasbroucq T (2005) Selective effects of partial striatal 6-OHDA lesions on information processing in the rat. *Eur J Neurosci* 21:1973–1983
- Da Cunha C, Wietzikoski EC, Dombrowski P, Bortolanza M, Santos LM, Boschen SL, Miyoshi E (2009) Learning processing in the basal ganglia: a mosaic of broken mirrors. *Behav Brain Res* 199: 157–170
- Domenger D, Schwarting RK (2005) Sequential behavior in the rat: a new model using food-reinforced instrumental behavior. *Behav Brain Res* 160:197–207
- Domenger D, Schwarting RK (2006) The serial reaction time task in the rat: effects of D1 and D2 dopamine-receptor antagonists. *Behav Brain Res* 175:212–222
- Domenger D, Schwarting RK (2007) Sequential behavior in the rat: role of skill and attention. *Exp Brain Res* 182:223–231
- Domenger D, Schwarting RK (2008) Effects of neostriatal 6-OHDA lesion on performance in a rat sequential reaction time task. *Neurosci Lett* 444:212–216
- Doyon J, Ungerleider LG (2002) Functional anatomy of motor skill learning. In: Squire LR, Schacter DL (eds) *Neuropsychology of memory*. Guilford, New York, pp 225–238
- Doyon J, Song AW, Karni A, Lalonde F, Adams MM, Ungerleider LG (2002) Experience-dependent changes in cerebellar contributions to motor sequence learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1017–1022
- Faure A, Haberland U, Conde F, El Massioui N (2005) Lesion to the nigrostriatal dopamine system disrupts stimulus-response habit formation. *J Neurosci* 25:2771–2780
- Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci ME, Canteras NS, Da Cunha C (2005) Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson’s disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosci Methods* 148:78–87
- Graybiel AM (1998) The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiol Learn Mem* 70:119–136
- Howell DC (2002) *Statistical methods for psychology*. Duxbury, Pacific Grove, CA
- Jinnah HA, Hess EJ (2003) Assessment of movement disorders in rodents. In: LeDoux M (ed) *Animal models of movement disorders*. Elsevier, New York, pp 55–71
- Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A (1998) Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol* 152:259–277

-
- Lindner MD, Plone MA, Francis JM, Blaney TJ, Salamone JD, Emerich DF (1997) Rats with partial striatal dopamine depletions exhibit robust and long-lasting behavioral deficits in a simple fixed-ratio bar-pressing task. *Behav Brain Res* 86:25–40
- Nissen MJ, Bullemer P (1987) Attentional requirements of learning: evidence from performance measures. *Cogn Psychol* 19:1–32
- Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25:563–593
- Paxinos G, Watson C (2005) The rat brain in stereotactic coordinates. Elsevier, London
- Reed J, Johnson P (1994) Assessing implicit learning with indirect tests: determining what is learned about sequence structure. *J Exp Psychol* 20:585–594
- Robbins TW, Giardini V, Jones GH, Reading P, Sahakian BJ (1990) Effects of dopamine depletion from the caudate-putamen and nucleus accumbens septi on the acquisition and performance of a conditional discrimination task. *Behav Brain Res* 38:243–261
- Sandberg PR, Bunsey MD, Giordano M, Norman AB (1988) The catalepsy test: its ups and downs. *Behav Neurosci* 102:748–759
- Scholtissen B, Deumens R, Leentjens AF, Schmitz C, Blokland A, Steinbusch HW, Prickaerts J (2006) Functional investigations into the role of dopamine and serotonin in partial bilateral striatal 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Pharmacol Biochem Behav* 83:175–185
- Schwartz RK (2009) Rodent models of serial reaction time tasks and their implementation in neurobiological research. *Behav Brain Res* 199:76–88
- Siebert RJ, Taylor KD, Weatherall M, Abernethy DA (2006) Is implicit sequence learning impaired in Parkinson's disease? A meta-analysis. *Neuropsychology* 20:490–495
- Vandenbossche J, Deroost N, Soetens E, Kerckhofs E (2009) Does implicit learning in non-demented Parkinson's disease depend on the level of cognitive functioning? *Brain Cogn* 69:194–199
- Werheid K, Ziessler M, Nattkemper D, Yves von Cramon D (2003) Sequence learning in Parkinson's disease: the effect of spatial stimulus-response compatibility. *Brain Cogn* 52:239–249
- Wilcox RR (1987) New designs in analysis of variance. *Annu Rev Psychol* 38:29–60
- Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW (2004) Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *Eur J Neurosci* 9:181–189

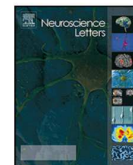
**STUDIE II: ACQUISITION AND PERFORMANCE IN A RAT SEQUENTIAL REACTION
TIME TASK IS NOT AFFECTED BY SUBTOTAL VENTRAL STRIATAL 6-OHDA
LESIONS**

PUBLIKATIONEN



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Acquisition and performance in a rat sequential reaction time task is not affected by subtotal ventral striatal 6-OHDA lesions

M.T. Eckart*, M.C. Hulse-Matia, D. Loer, R.K.W. Schwarting

Philipps-University of Marburg, Department of Psychology, Experimental and Physiological Psychology, Gutenbergstraße 18, D-35032 Marburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 January 2010

Received in revised form 20 March 2010

Accepted 30 March 2010

Keywords:

Striatum

Serial reaction time task

6-OHDA

Dopamine

Instrumental behaviour

Rat

ABSTRACT

Based on findings of experiments with humans, non-human primates and rodents, it is commonly accepted that dopaminergic basal ganglia processes play a crucial role in procedural and sequential learning. Primal evidence for this hypothesis came from serial reaction time tasks (SRTT) studies, demonstrating that healthy controls show increased reaction times when visual stimulus presentation switches from a previously learned sequence to random stimulus presentation. This so-called interference effect was reduced in patients with Parkinson's disease. Since ethical and methodical aspects limit neurobiological research in human subjects, we developed a rat version of the human SRTT, which can be used to study experimentally induced brain damage. In the present experiment we investigated the effects of bilateral 6-OHDA lesions of the ventral striatum on sequential learning. The lesions led to subtotal dopaminergic depletions in the ventral striatum (58–60%) and also minor depletions in the medial neostriatum (32–46%). These lesions impaired task acquisition only moderately and did not worsen sequential performance since lesion and control animals showed a comparable interference effect when the trained sequence was tested against random stimulus presentation or violated sequences. In contrast, in an earlier SRTT experiment with medial neostriatal dopaminergic lesions (58–66%), the lesion animals were clearly impaired in their sequential learning as compared to controls. Therefore, we assume that subtotal dopamine loss in the medial neostriatum, rather than the ventral striatum, has a substantial effect on sequential learning.

© 2010 Published by Elsevier Ireland Ltd.

The critical test in the present experiment is a food reinforced rat version (introduced by Domenger and Schwarting [7–10]) of the human SRTT, which was first introduced by Nissen and Bullemer [15]. Analogous to the human SRTT, it is a four-choice task in which nose poking into illuminated holes accords to human key pressing.

In humans, the SRTT has commonly been used to investigate the role of basal ganglia dopamine (DA) in sequential behaviour since some clinical studies indicated that patients with Parkinson's disease (PD) showed impaired SRTT performance (mostly assessed in terms of reaction time (RT), e.g. [23]). Some studies did not replicate these findings (for discussion see Werheid et al. [24]), and it was claimed that these inconsistencies might be due to heterogeneity of clinical populations and treatment conditions. Thus, models are widely accepted, which propose the involvement of DAergic basal ganglia processes for the SRTT [13,11,6,22]. Work in rats has shown that especially the medial part of the neostriatum may be crucial for sequential learning [12], while the ventral striatum/nucleus accumbens is more relevant for stimulus-reward learning [17], or generally for basic Pavlovian and instrumental conditioning [1].

In an earlier SRTT study on sequential performance [7], bilateral neostriatal 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesions were placed after rats had been trained on sequences. Such striatal 6-OHDA lesions permanently damage the DAergic neurons and are a common early stage model of PD in rodents [2]. We chose an early stage model of PD, because there is evidence, that deficits in implicit memory already occur in pre-symptomatic stages of PD [16] (for similarities between human and mammalian basal ganglia involvement in implicit learning see Doyon and Ungerleider [11]). Regarding sequential behaviour, animals with such DA lesions conducted less automated responses and did not retain their superior sequential RT performance, whereas they preserved their level of performance in terms of accuracy. Furthermore, the lesions were not sufficient to completely abolish sequential performance, but these animals were unable to further improve their SRTT performance after surgery while controls did. This result hints at a role for neostriatal DA in learning as compared to established performance. This hypothesis was supported by a recent experiment in which the neostriatum was lesioned by 6-OHDA prior to SRTT training [12]. These lesions resulted in subtotal DA depletions of 58–66% in the medial neostriatum. They led to deficits in sequential learning in terms of RT and response accuracy when compared to performance under random stimulus presentation.

* Corresponding author. Fax: +49 6421 2826621.

E-mail address: eckart@staff.uni-marburg.de (M.T. Eckart).

Unlike the neostriatum, we know of no experimental evidence for an involvement of the ventral striatum (including the nucleus accumbens) in sequential learning and performance. Cole and Robbins [4] found only minor effects of 6-OHDA lesions of the rat nucleus accumbens on performance in the 5-choice task, which is a serial but not a sequential one (see Schwarting [22]). Therefore, the present experiment was performed to test, whether bilateral ventral striatal 6-OHDA lesions affect sequential learning and performance in our rat sequential task. Since we had no explicit hypothesis concerning specific parts of the ventral striatum (like nucleus accumbens core or shell) we aimed at the whole lower third of the striatum around the nucleus accumbens (termed ventral striatum). After surgery, the animals underwent the same training and testing schedule as in the previous neostriatal lesion study [12]. First, the animals were trained in the SRTT on a 12-item sequence. Thereafter, two tests of sequential learning were applied. First performance during phases of sequential stimulus presentation was compared against random presentation (S-R-S-R test; [10]). Typically, rats show increased reaction times and less response accuracy under random conditions. In the second test (sequence violation test), the animals were run under sequential stimulus presentation [7], but after several minutes, single sequence items were violated. Typically, reaction times are increased to such violated items. Also, rats show indices of response automation since they often respond to the sequentially “expected” item.

Thirty male Wistar rats (Harlan-Winkelmann, Germany), weighing 250–274 g at the start of the experiment were used. They were kept under a 12:12 h light/dark cycle, housed singly with ad libitum access to water.

Surgery was performed under xylazine (Rompun®, Bayer, 0.5 ml/kg) and ketamine (Ketavet®, Pharmacia, 1 ml/kg) anaesthesia. The lesion group ($n = 20$) received injections of 1 μ l of 6-OHDA per injection site (concentration: 16 μ g/ μ l), dissolved in an ascorbate solution (1.0 mg/ml in 0.9% saline) into the ventral striatum via a Hamilton injection pump (Hamilton Co., USA) at a rate of 0.35 μ l/min. The coordinates (from bregma) were: anterior: +1.6; lateral: ± 1.8 ; ventral: -7.4 from dura according to Paxinos and Watson [18]. After injection, the cannula remained in place for further 5 min. Controls ($n = 10$) underwent the same procedure, but received only the ascorbate solution. After surgery, the animals were given 1 week for recovery.

We used the same experimental schedule as in the neostriatal lesion study [12]. All tests and apparatus were described in detail there. Thus, we only give a short description of the order of the experimental schedule:

- **Catalepsy test:** This test was used to scan the animals for gross motor deficits. The animals were placed with their forepaws on a rectangular plastic block (4.5x14x12.5 cm) and the time was measured until the animal moved its paws.
- **SRTT:** Before starting the SRTT, rats had to be food-deprived. They were kept between 80 and 85% of their free feeding weight. For SRTT testing (for details see [7–10]), we used modified operant chambers (MedAssociates) with four LED-equipped holes (i.e. nosepoke holes) arranged in a small alcove in a semi-elliptic way tilted towards the pellet-receptacle. The holes were numbered as: [1] upper left, [2] upper right, [3] bottom left, [4] bottom right. The pellet-receptacle was connected to a dispenser, which delivered adjustable amount of pellets (dustless precision pellets, 45 mg each, Bioserve, Bilaney Consultants, Germany). Basically, the rats had to respond to visually stimuli by poking into the illuminated (i.e. active) hole. After a correct response, the light was immediately lit in another hole. The order of the illuminated holes was either pseudo-random (i.e. the same hole was never lit twice in a row) or followed a second-order 12-item sequence (in each case two consecutive items predict the following item: 3-2-4-1-

3-4-2-1-2-3-1-4 [19]). Responding was reinforced on a fixed ratio schedule of 13 (FR 13), that is, reward was delivered after every 13th correct poke. This ensures that sequence and reinforcement are dissociated (single items of the sequence cannot be associated with reward delivery).

- **Basic training:** The animals were shaped daily (20 min each) until they reached the criterion of FR 13. Finally, a 5 s time limit for poking was applied. The active hole was illuminated until the rat poked (correct or incorrect) or until the time limit had expired (omission). In case of omissions and wrong pokes, feedback was provided by a tone and house light illumination. Then, stimulus presentation continued from that item, where the sequence had been interrupted [12].
- **SRTT training:** Using the FR 13, the rats were trained daily (20 min each) on the sequence until the lesion group showed a stable level of performance in terms of no significant RT improvements over 3 consecutive days.
- **S-R-S-R test:** Here, test conditions alternated between sequential and random stimulus presentation (min 1–5: seq₁, min 6–10: rand₁, min 11–15: seq₂, min 16–20: rand₂). The time limit for responding was 5 s, but the active hole was only illuminated for 1 s.
- **Sequence violation test:** In the first 5 min of this test, the stimuli were presented in the trained sequential order. Afterwards, approximately 20% of the sequences were violated by skipping one item of the sequence on the 9th position of the FR. By linking the violations to the FR, the errors occurred on different positions of the sequence. We analysed the effects of the violation on the reaction time and the type of pokes made at the violated positions. These pokes were categorised as: correct (into the illuminated hole), expected (into the skipped hole according to the trained sequence), and random errors (into any other hole).

The animals were decapitated under deep anaesthesia (pentobarbital-sodium, Narcoren®, Merial, Germany, 2.5 ml/kg) and the brains were immediately removed. The striata of both hemispheres were extracted and divided into three parts: ventral striatum, lateral neostriatum and medial neostriatum. Tissue samples were weighed in 0.05 M perchloric acid, sonicated, centrifuged and stored at -80°C . They were analysed for their contents of DA and serotonin using high performance liquid chromatography with electrochemical detection as described before [12].

For the calculation of RTs, only correct pokes (i.e. into illuminated holes) were taken into account. For accuracy, we calculated the percentage of correct pokes from the total pokes (correct and wrong pokes). All results are expressed as mean \pm S.E.M. Analyses were done using SPSS 17.0. All data were checked for normal distribution by Kruskal–Wallis tests. Since they fitted the normal distribution, only parametric tests were applied, i.e. ANOVAs and SIDAK-corrected t -tests.

Compared to controls, ventral striatum DA in the lesion group was significantly depleted, namely by $59.9\% \pm 7.98$ in the right ($t_{25} = -4.33$; $p < 0.01$) and by $57.94\% \pm 7.78$ in the left hemisphere ($t_{25} = -4.42$; $p < 0.01$).

In the medial neostriatum, the corresponding values were $31.95\% \pm 11.89$ right and $46.41\% \pm 11.18$ left, but depletion was significant only on the left side (right: $t_{27} = -1.62$; $p = 0.12$; left: $t_{27} = -2.27$; $p = 0.03$).

In the lateral neostriatum, DA depletions were not significant (right: $16.34\% \pm 11.34$, $t_{27} = -0.84$; $p = 0.409$; left: $6.68\% \pm 11.72$, $t_{26} = -0.29$; $p = 0.77$).

There were no group differences in serotonin in any of the structures (data not shown).

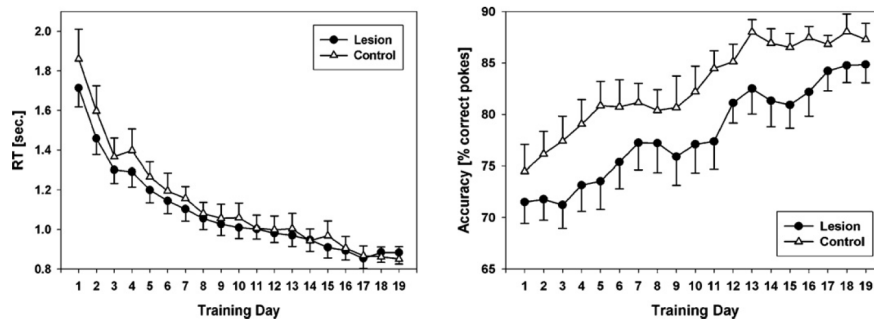


Fig. 1. (a/b) RT (in s; mean \pm S.E.M.) and accuracy (in %; mean \pm S.E.M.) during the 19-day period of sequential training. Each data point reflects the mean of a given daily 20-min period.

- **Behavior:**
 - *Catalepsy test:* This test did not yield differences between lesion and control group (data not shown).
- **SRTT:**
 - *Basic training:* On average, it took about 1 day more to shape the lesion group until they reached the FR 13 level (lesion: 6.79 days \pm 0.26; controls: 5.80 days \pm 0.29; $t_{27} = 2.37$; $p = 0.03$).

Note: Despite intensive efforts one animal of the lesion group did not reach the FR 13 criterion of the SRTT and could therefore not be tested behaviourally any further. This rat had the most severe DA depletions in the left hemisphere (left: medial neostriatum: –93%, lateral neostriatum: –91%, ventral striatum: –96%) whereas the right one was comparably weakly affected (medial: +16%, lateral: –53%, ventral: –27%).

- *SRTT training:* The criterion of no further RT enhancements over 3 consecutive days in the lesion group was reached after 19 training days ($p > 0.05$, indicated by a repeated measurement ANOVA, data not shown). The total training period (Fig. 1a and b) was then analysed by ANOVA with groups and days (repeated measurement) as factors. With respect to RT (Fig. 1a), a significant repeated measurement effect ($F_{1;18} = 79.72$; $p < 0.001$) was obtained, i.e. both groups enhanced their RT during training. There was no overall difference between groups ($F_{1;22} = 0.31$; $p = 0.58$) and no interaction between groups and training days ($F_{1;18} = 1.20$; $p = 0.26$). Analysis of the accuracy data (Fig. 1b) also revealed a significant repeated measurement effect ($F_{1;18} = 17.49$; $p < 0.001$) and no interactions ($F_{1;18} = 0.52$; $p = 0.95$). Descriptively, accuracy during training was lower in the lesion group, but statistically there was no significant difference between groups ($F_{1;18} = 2.06$; $p = 0.17$).
- *S-R-S-R test:* Descriptively, both groups showed a similar pattern in their RT (Fig. 2a) over the different phases of the S-R-S-R

test, namely an increase from the first sequential to the first random phase (seq₁, rand₁), but no substantial changes thereafter. An ANOVA with the factors group and test phases (repeated measurement: seq₁, rand₁, seq₂, rand₂) revealed a significant repeated measurement effect ($F_{3;27} = 3.83$; $p = 0.01$), no interaction ($F_{3;27} = 0.64$; $p = 0.59$) and no group effect ($F_{1;27} = 0.06$; $p = 0.81$). Post hoc tests did not reveal further significant differences between sequential and random performance.

The accuracy data of both groups (Fig. 2b) formed a “saw tooth shape”, which means that accuracy was higher during sequential- than during random stimulus presentation. An ANOVA revealed a significant repeated measurement effect ($F_{3;27} = 9.99$; $p < 0.01$), no interaction ($F_{3;27} = 1.79$; $p = 0.16$), and no group effect ($F_{1;27} = 0.09$; $p = 0.77$). Post hoc tests revealed significantly higher accuracy during sequential conditions in the lesion group (rand₁ vs. seq₂: $p < 0.01$; seq₂ vs. rand₂: $p < 0.01$).

- *Sequence violation test:* Here, we analysed RTs at the different positions of the FR (positions 2–13) for violated and non-violated sequences (Fig. 3a and b). During non-violated stimulus presentation, both groups showed a typical ratio run, as the RT decreased, especially during the 1st half of the FR ratios. During violated sequences, the curve patterns of both groups were interrupted at the violated position, since the RTs of both groups were significantly higher at the 9th position than at the same position of non-violated sequences (controls: $t_9 = -5.92$, $p < 0.01$; lesion group: $t_{18} = -4.13$, $p < 0.01$).

Analysing the types of pokes at these violated positions, we found that the lesion group made 8.05 ± 0.64 correct pokes, 2.32 ± 0.34 expected errors, and 1.21 ± 0.27 random errors. The cor-

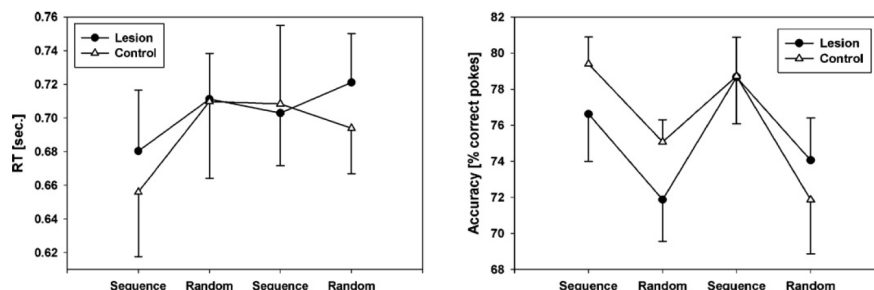


Fig. 2. (a/b) SRSR RT (in s; mean \pm S.E.M.) and accuracy (in %; mean \pm S.E.M.) during consecutive 5-min blocks during which stimulus presentation followed either the previously trained sequential order (seq. I, seq. II) or a random order (rand. I and rand. II).

Please cite this article in press as: M.T. Eckart, et al., Acquisition and performance in a rat sequential reaction time task is not affected by subtotal ventral striatal 6-OHDA lesions, *Neurosci. Lett.* (2010), doi:10.1016/j.neulet.2010.03.075

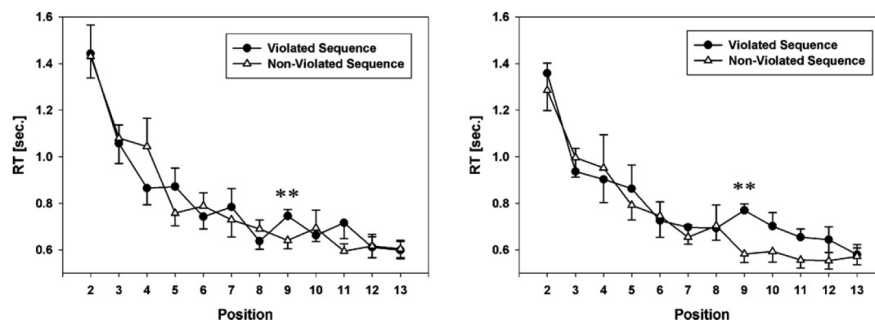


Fig. 3. (a/b) Serial pattern of regular and violated sequences shown by the lesion (a) and by the control group (b). The violations occurred at position 9 of the FR schedule in randomly chosen sequences. Note that the 1st response after food delivery is not shown, since its duration is flawed by previous food pellet consumption. ** $p < 0.01$ as compared to position 9 of the non-violated sequences.

responding values for controls were 7.20 ± 0.66 , 3.10 ± 0.66 , and 1.10 ± 3.15 , respectively. A 2×3 ANOVA yielded a general difference between response types ($F_{1,2} = 1.04$; $p > 0.01$), but no group effects or interactions (p -values > 0.05). Subsequent post hoc tests revealed that both groups made more right pokes than expected errors ($p < 0.001$) and random errors ($p < 0.001$), and more expected errors than random errors ($p = 0.007$).

This study was designed to examine the effects of subtotal DA depletions in the rat ventral striatum on sequential learning and performance. Subtotal, rather than complete DA depletions were tested, since the latter typically lead to severe performance impairments, which prevent testing of general instrumental [1] and thus sequential behaviour. This unwanted effect was observed in the present study in one animal with severe DA lesions, which had to be excluded from further analysis since it did not acquire the task despite extensive training (as noted in the results under “basic training”). Identical to an earlier experiment with neostriatal DA lesions [12], rats were first lesioned and then trained on the sequence to test lesion effects on sequential learning. Thereafter, performance under sequential stimulus presentation was tested against that under random stimulus presentation and violated sequences.

The lesions led to subtotal DA depletions in the ventral striatum, but also to mild depletions in the medial neostriatum. This later effect was most probably due to the injection tract, which led through the medial neostriatum. The degree of DA loss in the ventral striatum caused by the 6-OHDA injections is comparable to those found by previous investigators [3,20,4,5,14]. These studies also found similar minor DA depletions in the neostriatum except of Ishiwari [14], but there, DA levels are only reported for the NAcc and ventrolateral striatum.

The only behavioural deficit, which was observed during acquisition of our task, was that it took moderately but significantly longer to shape the lesion animals until they reached FR 13. This effect is in line with literature showing that ventral striatal DAergic processes are crucial for stimulus-reward learning or for instrumental learning [5,14,1,17].

The present weakness of effect may not only be due to the factor lesion degree but also to the choice of operant, since nose poking is a rather simple action (for instance in contrast to lever pressing). Salamone [21] showed that the effect of DA lesion depends on task requirements and thus effort needed to solve the task.

The results of the tests performed after the acquisition phase indicate that once the necessary FR 13 level is reached, sequential performance is independent from ventral striatal DA processes, at least in case of subtotal depletions. The significant repeated measurement effects of the S-R-S-R analyses indicate that both groups profited in terms of accuracy from the sequential- as compared

to random stimulus presentation. The lack of between-group and interaction effects indicate that lesion and control group did not differ in their performance and showed comparable interference effects. In case of RT, the data from the S-R-S-R test are less clear, since only the first switch from sequence to random stimuli presentation resulted in faster RTs, whereas the subsequent switch did not affect RT as hypothesised. Therefore, the measure of RTs in the present S-R-S-R test did not yield the expected patterns [12]. We assume that accuracy rather than RT is the more sensitive measure in this test.

Also, the sequence violation test indicated that both groups had acquired the sequence to the same extent. This was indicated by increased RTs at the violated position in both groups and by the pattern of pokes made at this position. Accordingly, rats made more automated responses in terms of expected errors than random errors at the violated positions, which is a typical pattern in this test [7].

In the earlier neostriatal lesion study [12] we could demonstrate, that subtotal DAergic lesions in the neostriatum – especially in the medial part – impaired sequential learning. Rats with such lesions showed no interference effect in their RT patterns and a reduced interference effect in terms of accuracy, whereas controls showed clear interference effects in both variables. The sequence violation test indicated, that the sequence was less automated in lesioned animals, since sequence violations had no effect on RT of the lesion group but in controls. Also, controls had a higher tendency to make expected errors (highly automated pokes into the correct hole according to the trained sequence).

In the present experiment, neostriatal DA was also depleted (7–46%) but to a lesser degree than in the previous one (58–66%; [12]). Based on these findings, one might speculate, that DA depletions in the medial neostriatum are critical and must be above a certain threshold to impair sequential learning. In the present experiment, medial neostriatal DA depletions were below 50%, whereas in the previous neostriatal lesion study [12], medial neostriatal depletions were around 60–70% and had a clear effect on sequential learning. However, it has to be mentioned that the results of the present study cannot rule out, that a higher degree of DAergic depletions in the ventral striatum, might have caused deficits in sequential learning.

Taken together the results of our works are in accordance with the hypothesis of Packard and Knowlton [17] that sequential learning depends on the integrity of the medial neostriatum while ventral striatal DAergic processes are not or marginally involved in sequential learning. Also, we think that our rat SRTT has proven to be a sensitive tool for research on procedural mnemonic deficits in preclinical models of PD (without motor deficits) and their neurobiological mechanisms.

References

- [1] A. Alcaro, R. Huber, J. Panksepp, Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: an affective neuroethological perspective, *Brain Res. Rev.* 56 (2007) 283–321.
- [2] I. Branchi, I. D'Andrea, M. Armida, T. Cassano, A. Pezzola, R.L. Potenza, M.G. Morgese, P. Popoli, E. Alleva, Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model, *J. Neurosci. Res.* 86 (2008) 2050–2061.
- [3] M. Carli, G.H. Jones, T.W. Robbins, Effects of unilateral dorsal and ventral striatal dopamine depletion on visual neglect in the rat: a neural and behavioural analysis, *Neuroscience* 29 (1989) 309–327.
- [4] B.J. Cole, T.W. Robbins, Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens septi on performance of a 5-choice serial reaction time task in rats: implications for theories of selective attention and arousal, *Behav. Brain Res.* 33 (1989) 165–179.
- [5] M.S. Cousins, J.D. Sokolowski, J.D. Salamone, Different effects of nucleus accumbens and ventrolateral striatal dopamine depletions on instrumental response selection in the rat, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46 (1993) 943–951.
- [6] C. Da Cunha, E.C. Wietzikoski, P. Dombrowski, M. Bortolanza, L.M. Santos, S.L. Boschen, E. Miyoshi, Learning processing in the basal ganglia: a mosaic of broken mirrors, *Behav. Brain Res.* 199 (2009) 157–170.
- [7] D. Domenger, R.K. Schwarting, Effects of neostriatal 6-OHDA lesion on performance in a rat sequential reaction time task, *Neurosci. Lett.* 444 (2008) 212–216.
- [8] D. Domenger, R.K. Schwarting, Sequential behavior in the rat: a new model using food-reinforced instrumental behavior, *Behav. Brain Res.* 160 (2005) 197–207.
- [9] D. Domenger, R.K. Schwarting, Sequential behavior in the rat: role of skill and attention, *Exp. Brain Res.* 182 (2007) 223–231.
- [10] D. Domenger, R.K. Schwarting, The serial reaction time task in the rat: effects of D1 and D2 dopamine-receptor antagonists, *Behav. Brain Res.* 175 (2006) 212–222.
- [11] J. Doyon, L.G. Ungerleider, Functional anatomy of motor skill learning, in: L.R. Squire, D.L. Schachter (Eds.), *Neuropsychology of Memory*, Guilford, New York, 2002, pp. 225–238.
- [12] M.T. Eckart, M.C. Huelse-Matia, R.S. McDonald, R.K. Schwarting, 6-hydroxydopamine lesions in the rat neostriatum impair sequential learning in a serial reaction time task, *Neurotox. Res.* 17 (2010) 287–298.
- [13] A.M. Graybiel, The basal ganglia and chunking of action repertoires, *Neurobiol. Learn. Mem.* 70 (1998) 119–136.
- [14] K. Ishiwari, S.M. Weber, S. Mingote, M. Correa, J.D. Salamone, Accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: modulation of work output by different ratio or force requirements, *Behav. Brain Res.* 151 (2004) 83–91.
- [15] M.J. Nissen, P. Bullemer, Attentional requirements of learning: evidence from performance measures, *Cogn. Psychol.* 19 (1987) 1–32.
- [16] T. Ogura, M. Ogata, H. Akita, S. Jitsuki, L. Akiba, K. Noda, S. Hoka, M. Saji, Impaired acquisition of skilled behavior in rotarod task by moderate depletion of striatal dopamine in a pre-symptomatic stage model of Parkinson's disease, *Neurosci. Res.* 51 (2005) 299–308.
- [17] M.G. Packard, B.J. Knowlton, Learning and memory functions of the basal ganglia, *Annu. Rev. Neurosci.* 25 (2002) 563–593.
- [18] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [19] J. Reed, P. Johnson, Assessing implicit learning with indirect tests: determining what is learned about sequence structure, *J. Exp. Psychol.: Learn. Mem. Cogn.* 20 (1994) 585–594.
- [20] T.W. Robbins, V. Giardini, G.H. Jones, P. Reading, B.J. Sahakian, Effects of dopamine depletion from the caudate-putamen and nucleus accumbens septi on the acquisition and performance of a conditional discrimination task, *Behav. Brain Res.* 38 (1990) 243–261.
- [21] J.D. Salamone, M. Correa, A. Farrar, S.M. Mingote, Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits, *Psychopharmacology (Berl.)* 191 (2007) 461–482.
- [22] R.K. Schwarting, Rodent models of serial reaction time tasks and their implementation in neurobiological research, *Behav. Brain Res.* 199 (1) (2009) 76–88.
- [23] R.J. Siegert, K.D. Taylor, M. Weatherall, D.A. Abernethy, Is implicit sequence learning impaired in Parkinson's disease? A meta-analysis, *Neuropsychology* 20 (2006) 490–495.
- [24] K. Werheid, M. Ziessler, D. Nattkemper, D. Yves von Cramon, Sequence learning in Parkinson's disease: the effect of spatial stimulus-response compatibility, *Brain Cogn.* 52 (2003) 239–249.

PUBLIKATIONEN

**STUDIE III: DORSAL HIPPOCAMPAL LESIONS BOOST PERFORMANCE IN THE RAT
SEQUENTIAL REACTION TIME TASK (IN VORBEREITUNG)**

PUBLIKATIONEN

**Dorsal hippocampal lesions boost performance in
the rat sequential reaction time task**

Eckart MT, Huelse-Matia MC, Loer D, Schwarting RKW

Philipps-University of Marburg, Department of Psychology,
Experimental and Physiological Psychology
Gutenbergstraße 18, 35032 Marburg, Germany

Author for correspondence:

Moritz Thede Eckart

Philipps Universität Marburg, Fachbereich Psychologie

Gutenbergstraße 18

D-35032 Marburg

fax: ++49-6421-2826621

e-mail: eckart@staff.uni-marburg.de

Abstract

It is commonly accepted, that the hippocampus plays a major role in declarative memory in general and especially in spatial memory in rodents. However, the interplay between hippocampal function and non declarative memory systems, like procedural S-R or sequential learning is less clear: depending on tasks requirements an interaction, dissociation or interference between hippocampal function and other memory systems may occur.

The present study was conducted to investigate the influence of ibotenic dorsal hippocampal lesions on learning and performance in a rat version of a sequential reaction time task (SRTT, adopted from the human version, which was presented 1987 by Nissen & Bullemer). The lesions led to a hippocampal volume reduction of 45-47% (dorsal lesion, ventral sparing) which caused spatial memory deficits in a place object recognition test. With respect to sequential learning, our earlier studies had revealed substantial impairments in case of dorsal striatal dopaminergic lesions. The present hippocampal lesioned animals, however, unexpectedly showed superior performance throughout the SRTT shaping, testing and training as compared to sham-treated subjects and non operated controls. This superior performance resulted in a higher degree of automated sequential behaviour after the sequential training. These data show the rather rare case, that performance in a procedural and quite complex test can be enduringly enhanced by hippocampal lesions.

One possible explanation for this effect is that hippocampal activity in rodents interferes with other memory systems during the acquisition of procedural tasks with very low spatial requirements, as used here.

Introduction

Since Nissen and Bullemer presented their human SRTT in 1987, this task has often been used to study the neural principles of sequential learning, which is a form of procedural learning. In this task, subjects have to respond to visual stimuli by rapid key pressing. These are presented either in a random or sequential fashion, and reaction time (RT) typically increases during random stimulus presentation as compared to preceding sequential presentation (termed interference).

Due to clinical SRTT studies in which Parkinson's disease patients showed deficits in sequential learning (for review see: Siegert et al. 2006) and imaging studies revealing striatal recruitment during sequential learning (e.g. Badgaiyan et al 2007, Werheid et al. 2003), various models were proposed that suggest a crucial role for dopaminergic

processes in the striatum in sequential learning (Doyon & Ungerleider 2002, Graybiel 1998, Da Cunha et al. 2009, Schwarting 2009, Packard & Knowlton 2002), and these were recently supported by our animal studies with a rat version of the SRTT (Eckart et al. 2010a/b).

In contrast, the role of the hippocampus – which is mainly associated with human declarative memory (Squire 1992) and spatial memory or relational memory in rats (Compton 2004, Bast et al. 2009, de Hoz et al. 2003, Morris 2007) – in sequential learning is less univocal. Some studies with patients suffering from hippocampal damage reported preserved sequential learning (e.g. Nissen & Bullemer 1987 in Korsakoff patients, Hopkins et al. 2004 in patients with hypoxia, Nagy et al. 2007 in patients with mild cognitive impairments), whereas others (Ferraro et al. 1993) found preserved sequential learning in patients with very mild dementia, but deficits in patients with mild dementia. Neuroimaging studies, on the other hand, have indicated striatal and hippocampal activation during sequential learning and correlations between hippocampal activation and sequential learning (Schedan et al. 2003, Albouy et al. 2008, Gheysen et al. 2010). Finally, in a rat study with an SRTT, Christie & Dalrymple-Alford (2004) found sequential deficits in case of radiofrequency lesions of the striatum but preserved performance in case of hippocampal lesions.

Due to these conflicting results the present study was conducted where we investigated the role of hippocampal ibotenic acid lesions in sequential learning in our food reinforced rodent version of the SRTT that has a high face validity to the human version (Domenger & Schwarting 2005, 2007). We focussed our lesions on the dorsal hippocampus, since this area is associated with cognitive functions while the ventral (or temporal) hippocampus is associated with stress, emotion and affect (Fanselow & Dong 2010). Three groups were tested: lesion animals, sham-injected subjects, and non operated controls. The degree of the lesions was analysed by MRI. To validate the lesions behaviourally, we conducted a place object recognition test, since this test has repeatedly revealed deficits in rats with dorsal hippocampal lesions (Kart-Teke et al. 2006, Dere et al. 2006). In the SRTT, the animals were trained on a specific sequence until they reached a stable level of performance. After training, two tests were applied. First, sequential performance was tested against that during random stimulus presentation (termed S-R-S-R test). This test is taken as an indicator of the interference effect. In the second test, we presented violated sequences, namely by skipping one sequential item in about 20% of the presented sequences (sequence viola-

tion test). Here, the increase in reaction times and the response types were analysed. This test is taken as an indicator for the degree to which sequential behaviour is automated. Because hippocampal lesions may alter interoceptive hunger and satiety signals (Davidson et al. 2010), we additionally conducted a “food consumption test”. In the present study the hippocampal lesion group showed the expected deficit in spatial learning in the place object recognition test. Unexpectedly, however, performance in the SRTT was not only spared but was clearly superior as compared to controls both, in terms of reaction time and accuracy. Whether this superior performance of hippocampal lesioned animals may reflect enhancements in sequential learning or general advantages in instrumental learning will be topic of the discussion.

Materials and Methods

Subjects:

Twenty-seven male Wistar rats (Harlan-Winkelmann, Netherlands), weighing 250-274 g at the start of the experiment were used. They were kept in an animal room (21-25 °C; 31-47% humidity) under a 12:12 h light/dark cycle and were housed singly with ad libitum access to water. After their arrival, the animals were handled on the first three days (3 min each). Experiments were conducted in accordance with the ethical regulations for animal experimentation at the Philipps-University of Marburg.

Surgery:

Surgery was performed under xylazine (Rompun®, Bayer, 0.5 ml/kg) and ketamine (Ketavet®, Pharmacia, 1 ml/kg) anaesthesia. The coordinates (adopted from Bast et al. 2009) from bregma according to Paxinos and Watson 2007 and the injection volumes are summarised in table 1. Injections were made using a 1 µl SGE syringe (26ga, 0.47 mm diam. needle; SGE Analytical Science). After each injection, the syringe remained in place for further 3 min. to allow the neurotoxin to diffuse. The lesion group (n=12) was injected with ibotenic acid (Sigma Alrich; 10 mg/ml in 0.1 M phosphate-buffered saline). The sham group (n=7) underwent the same surgical procedure, but only the phosphate-buffered saline vehicle was injected. The control group (n=8) was not anesthetized or operated. After surgery the animals were given two weeks for recovery.

Object Place Recognition Test:

The object place recognition test was conducted directly after the recovery phase, which is two weeks after surgery. First, rats were habituated to the test apparatus, i.e. a small home-made open-field (60*60*60 cm) for three consecutive days by placing

them into the box for 20 min each. The habituation was conducted without the test objects (see below). To facilitate spatial orientation, a white plastic disc of 5 cm diameter was attached in the middle to one of the walls about 40 cm above the floor of the box. Diffuse white light provided an illumination density of approximately 10 lux at the center of the box, which was equipped with a digital camera (EverFocus EQ 150, Taiwan, Taipei), mounted 1.51 m above the floor of the box. 24 hours after the last habituation session the place object recognition task was conducted. Each rat was presented with two identical samples of the same object in the first (T_1) and second (T_2) trial. For each rat we used either two silver iron cylinders (5 cm in diameter, 8 cm high) or two solid glass pillars (6 cm in diameter, 8 cm high). Objects and spatial location were counterbalanced over groups. In T_1 the objects were placed in one of the back corners of the box (Figure 1), with the object's center point situated 15 cm away from the walls. In T_2 one of the objects was moved to one of the front corners of the activity box (Figure 1). In T_1 and T_2 the rats were placed near the front wall, and allowed to explore the apparatus and items for 5 min. During the inter-trial interval the animal was placed in its home cage for 20 min. Exploratory behaviour was assessed by measuring distance travelled and time of exploration. Object exploration was scored when the rat's nose touched the object or when it was directed towards it within a distance of 5 cm. For T_1 and T_2 only the first 3 min. were analysed, since pilot studies (unpublished data) revealed, that preference in exploratory behaviour towards the displaced object is most prominent during this period.

For the statistical analysis the discrimination ratio of T_2 was calculated as follows (adopted by Bevins & Besher 2006): exploration time displaced object

$$\left(\frac{\text{exploration time displaced object}}{\text{exploration time displaced object} + \text{exploration time stationary object}} \right).$$

The object place recognition data were analysed with the program VIEWER2®, BIOBSERVE GmbH, Germany.

SRTT:

The SRTT training and testing started 19 days after surgery. During the SRTT training and testing phase, the animals received food only during (food pellets, see below) and directly after (Altomin rat chow, Altrumin, Germany) daily instrumental sessions. Instrumental training and testing periods took place between 9 and 16 h of the light phase. In order to ensure, that they maintained 80-85% of their free feeding weight, they were fed individually after the instrumental sessions with weighted portions of

Altromin chow according to their body weight and the number of pellets obtained during the instrumental session.

For SRTT testing (for details see Domenger & Schwarting 2008, Eckart et al. 2010a/b), we used modified operant chambers (MedAssociates) with four LED-equipped holes (i.e. nosepoke holes) arranged in a small alcove in a semi-elliptic way tilted towards the pellet-receptacle. The holes were numbered as follows: [1] upper left, [2] upper right, [3] bottom left, [4] bottom right. The pellet receptacle was connected to a dispenser, which delivered adjustable pellet amounts (dustless precision pellets, 45 mg each, Bioserve, Bilaney Consultants, Germany). Basically, the rats had to respond to visually stimuli by poking into the illuminated (i.e. active) hole. After a correct response, the light was immediately lit in another hole. The order of the illuminated holes was either pseudo-random (i.e. the same hole was never lit twice in a row) or followed a 12 item sequence (3-2-4-1-3-4-2-1-2-3-1-4). This is a so-called second-order sequence (Reed and Johnson 1994) since two consecutive items are necessary to predict the next one. Responding was reinforced on a fixed ratio schedule of 13 (FR 13). This ensures that sequence and reinforcement are dissociated, i.e. single items or parts of the sequence cannot be associated with reward delivery.

Basic training: The animals were shaped and trained daily (20 min. each) until they reached the criterion of FR 13. The basic training started by placing the animals into the operant chamber, where hole 3 was illuminated and reinforced on FR 1. Incorrect pokes, that is, pokes into any of the other three holes, were punished by turning on house light and a tone. Animals were shaped until they showed a stable level of poking into hole 3 and subsequent food consumption. When this criterion was reached, the procedure was repeated with the other holes in the following succession: 3-4-2-1-3.

In the next step, switching between the position of the activate holes was gradually enhanced, until the position was switched after each correct poke. In the last step the FR criterion was gradually increased, until the animals reached the necessary FR 13 criterion.

Finally, a 5 sec. time limit for poking was applied, that is, the active hole was illuminated until the rat poked (correct or incorrect) or until the time limit had expired (omission). In case of omissions and incorrect pokes, feedback was provided to the rat by a tone and illumination of the house light. Then, stimulus presentation continued from that item, where the sequence had been interrupted (Eckart et al. 2010).

Analysed parameters: Accuracy: Here, the proportion of correct to incorrect pokes was calculated. All pokes into non-illuminated holes, excluding those during break time and double pokes (two pokes into the same hole within 1 sec.) were termed “incorrect pokes”. All pokes into illuminated (i.e., active) hole within the 5 sec. time limit were termed “correct pokes”. RT: For RT analyses, only correct pokes on FR positions 2-13 were taken into account. Reaction time to the position 1 of the FR was not evaluated since this measure is flawed by the durations of reward consumption.

SRTT training: Using the FR 13, the rats were trained daily (20 min. each) on the sequence until all groups showed a stable level of performance in terms of no further significant reaction time (RT) improvements over 2 consecutive days. This level was reached after 15 days of training.

S-R-S-R test: Here, test conditions alternated between time blocks of sequential and random stimulus presentation (min. 1-5: seq₁, min. 5-10: rand₁, min. 10-15: seq₂, min. 15–20: rand₂). The time limit for responding was 5 s, but the active hole was only illuminated for 1 s.

Sequence violation test: In the first 5 min. of this test, the stimuli were presented in the trained sequential order. Then, approximately 20% of the sequences were violated by skipping the item on the 9th FR position. By linking the violations to the FR, the errors occurred on different positions of the sequence. We analysed the effects of violation on reaction times and the type of responses made at the violated positions. These responses were then categorised as follows: correct (pokes into the illuminated hole), expected errors (pokes into the skipped hole - according to the trained sequence), and random errors (pokes into any other hole).

Food consumption Test:

This test took place 3 weeks after completion of SRTT testing. It was conducted to test if the groups differed in their food consumption behaviour when no instrumental responses were required (Bakshi & Kelley 1994). The rats were food deprived one day prior to the first testing. On the next day (test day 1 with food deprivation), the animals were placed into a cage, which had the same size as their home cage (378 x 217 cm) but had no bedding and a glass trough (90 mm diameter, 15 mm height) mounted on the floor. First, the animals had 5 min. for habituation. Then, they were briefly removed from the test cage and 3g of dustless precision pellets (the same pellets as in the SRTT) were put into the trough, and the animals had another 3 min. to

consume the pellets. Thereafter, the animals were removed from the cage and it was assessed if they had eaten all pellets within the time limit. After the test, the animals were put back to their home cages and fed ad libitum again. On the next day the same procedure was repeated (test day 2 without food deprivation).

MRI analyses:

MRI scans were done at the “Zentrum für Bildgebende Verfahren (ZeBiV)” of the Philipps-University of Marburg with a 7 Tesla Clinscan 70/30 small animal MRI (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). During scanning, rats were anaesthetised with Isofloran (Baxter GmbH, Unterschleißheim, Germany). For lesion validation we used images with the following parameters (similar to Lee et al. 2009): repetition time (TR) = 3000 ms; echo time (TE) = 31 ms; number of slices = 17; slice thickness = 0.7 mm; field of view (FoV) = 40 x 40 mm; matrix = 320 x 320; final spatial resolution = 0.125 x 0.125 x 0.7 mm. The first coronal slices started from approximately -8.0 mm from bregma and ended at approximately +2.27 according to the atlas of Paxinos and Watson (2007). To measure the relative volume of spared hippocampal tissue, the remaining hippocampal area (dentate gyrus, CA1-3 fields, subiculum) of the MRI scans were measured by ImageJ (Version 1.43q; <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). These areas were summed up for each brain, and the mean hippocampal area was calculated for each group. The relative hippocampal volume was calculated by dividing the hippocampal area in individual brains by the mean hippocampal area determined for the control group.

Statistical analyses:

Analyses were done using SPSS 17.0. All data were checked for normal distribution by Kruskal-Wallis tests. Since they fitted the normal distribution, only parametric tests were applied, i.e. t-tests, ANOVAs and SIDAK-corrected post hoc tests. The object recognition test was analysed by t-tests (because of directional hypotheses one tailed). For the calculation of the RTs, only correct pokes (i.e. into illuminated holes) were taken into account. For accuracy, we calculated the percentage of correct pokes from the total pokes (correct and wrong pokes). The correlation between RT and accuracy were calculated by Pearson's correlation coefficient. The data of the food consumption test were analysed by Chi Square tests. All results are expressed as means \pm SEM.

Results

Hippocampal tissue reduction:

The MRI scans (Fig. 2) descriptively show clear lesions of the dorsal hippocampus with prevalent sparing of the ventral hippocampus, and only minor lesions of the adjacent cortex in some of the lesioned animals. In the sham group, the injection tracts are clearly apparent with no further hippocampal damage. The quantitative MRI analyses revealed significant hippocampal volume reduction in both hemispheres in the lesion group: residual tissue, left: $45.14 \pm 4.76\%$ ($t_{18} = 7.038$; $p < 0.001$), right $46.71 \pm 5.06\%$ ($t_{18} = 7.031$; $p < 0.001$) as compared to the control group (left: $100 \pm 3.19\%$; right: $100 \pm 2.77\%$). In the sham group, hippocampal volume was not significantly different from these control levels (left: $4.03 \pm 3.11\%$, $t_{13} = 0.899$; $p = 0.385$; right: $5.76 \pm 2.35\%$, $t_{13} = 1.558$; $p = 0.137$).

Object Place Recognition Test:

Habituation: During the three habituation sessions, the lesion group descriptively showed higher activity in terms of travelled distance (Figure 3), but an ANOVA with groups as between group factor and habituation days as repeated measurement factor revealed no repeated measurement effect ($F_{2,2} = 0.962$; $p = 0.389$), no interaction ($F_{2,26} = 0.450$; $p = 0.772$) and an only marginally significant group effect ($F_{2,26} = 3.289$; $p = 0.055$).

Test: During T_1 , none of the groups showed a preference in its exploratory behaviour towards one of the objects, nor did the groups differ in the time spent with exploring the objects as indicated by an ANOVA with groups as between group factor and objects as repeated measurement factor (group factor: $F_{2,26} = 0.661$; $p = 0.525$; repeated measurement factor: $F_{2,1} = 0.125$; $p = 0.727$; interaction: $F_{2,26} = 2.441$; $p = 0.108$). Exploration time of object 1 was: controls: 12.99 ± 2.94 s; shams: 11.50 ± 1.64 s; lesion group: 17.38 ± 1.65 s, and exploration time of object 2 was: controls: 15.21 ± 2.92 s; shams: 14.25 ± 2.03 s; lesion group: 13.88 ± 1.38 s.

Fig. 4 shows the discrimination ratio in T_2 compared to chance preference, which was defined as a discrimination ratio of 0.5. The control group showed the highest preference towards the displaced object (exploration time displaced object: controls: 29.29 ± 3.71 s; shams: 19.60 ± 2.70 s; lesion group: 18.36 ± 1.46 s; exploration time stationary object: controls: 12.43 ± 1.12 s; shams: 14.32 ± 1.91 s; lesion group: 13.05 ± 1.24 s). Statistic analysis of the mean discrimination ratio revealed a significantly higher relative preference of the control group towards the moved object as compared to the

lesion group ($t_{18} = 1.95$ $p = 0.034$) and the sham group ($t_{13} = 1.92$ $p = 0.039$). There was no significant difference in the discrimination ratio of the sham and lesion group ($t_{17} = 0.32$ $p = 0.378$). The discrimination ration of all three group differed significantly from chance (control group: $t_7 = 4.02$; $p = 0.003$; lesion group: $t_{11} = 3.04$; $p = 0.006$; sham group: $t_6 = 2.06$; $p = 0.043$).

SRTT:

Training: During the 15-day training period, that is when all rats worked under the 12-item sequential condition and an FR 13, RTs of the correct pokes (Figure 5) decreased over days and run asymptotically towards the abscissa in all groups (ANOVA, factor days: $F_{2;14} = 113.709$; $p < 0.001$). Most importantly, the lesion group showed faster RTs (factor groups; $F_{2;26} = 15.429$; $p < 0.001$) and there was a significant interaction between groups and days ($F_{2;26} = 1.762$; $p = 0.011$). Post hoc test revealed significant differences between lesion group and controls on all training days except 1 and 15 (p-values ranging between 0.024 and >0.001), and between lesion group and shams on all training days (p-values ranging between 0.014 and >0.001). There were no significant differences between controls and shams.

Response accuracy (Figure 6) increased over the training period in all three groups ($F_{2;14} = 40.273$; $p < 0.001$), but the increase was strongest in the lesion group (factor groups: $F_{2;26} = 4.809$; $p = 0.018$; interaction: $F_{2;26} = 4.809$; $p = 0.018$), which reached a performance level of more than 90% correct pokes after about 10 days of training. $F_{2;26} = 1.2012$; $p = 0.226$). Post hoc tests revealed significant differences between lesion group and controls on training days 4, and 6-14 (p-values ranging between 0.044 and 0.001), and between lesion and sham group on days 8, 11-13 and 15 (p-values ranging between 0.045 and 0.012). There were no significant differences between controls and shams.

As an additional measure of performance outcome, we also analysed the number of successfully completed FR 13 runs: On the last training day, the lesion group finished such runs 66.17 ± 3.93 times, which was significantly more than in the control group (42.62 ± 5.01 ; $t_{18} = 3.732$; $p = 0.002$) and in the sham group (35.71 ± 7.24 ; $t_{17} = 4.056$; $p = 0.001$), whereas there was no difference between controls and shams ($t_{13} = -0.802$; $p = 0.437$).

S-R-S-R test: In this test, sequential and random conditions were tested in consecutive 5 min. periods. During the S-R-S-R test, the lesion group finished 50.77 ± 3.59 FR runs, which was significantly more often than in the control group (33.50 ± 3.57 ; $t_{18} =$

3.212; $p = 0.005$) and in the sham group (24.43 ± 4.74 ; $t_{17} = 4.390$; $p < 0.001$). There was no difference between controls and shams in this measure ($t_{13} = -1.553$; $p = 0.144$).

Reaction time: Overall, the lesion group showed significantly faster RTs than the control- and sham group, but the RT measures failed to distinguish between sequential and random stimulus presentation in all three groups (no interference effect in terms of increased RTs during random stimulus presentation, data not shown).

Accuracy (Figure 7): The patterns of all groups formed a typical “saw tooth shape”, which means that accuracy was higher during sequential stimulus presentation and lower during random stimulus presentation. These data were analysed with an ANOVA with groups (lesion-, sham-, control group) as between group factor and condition (seq₁, rand₁, seq₂ and rand₂) as repeated measurement factor: This analysis revealed a significant repeated measurement effect ($F_{2;3} = 11.889$; $p < 0.001$), a significant group effect ($F_{2;26} = 5.751$; $p = 0.009$), and no significant interaction ($F_{6;26} = 1.477$; $p = 0.198$). Post hoc tests for between group differences revealed, that the lesion group did not differ from controls ($p = 0.100$) but had higher accuracy than shams ($p = 0.011$), and there was no difference between shams and controls ($p = 0.712$). Post hoc tests for the repeated measurement factor revealed, that accuracy generally increased from rand₁ to seq₂ ($p < 0.001$) and decreased from seq₂ to rand₂ ($p = 0.003$). Furthermore, accuracy was significantly lower during seq₁ than during seq₂ ($p = 0.028$).

RT – accuracy correlations: To test for an RT accuracy trade-off, we correlated the two variables for the S-R-S-R data separately for groups (lesion, sham, control) and conditions (seq₁, rand₁, seq₂, rand₂). There were no significant correlations in the lesion- and control group, while there was one significant correlation between accuracy and RT in the sham group in seq₂ ($r = -0.902$; $p = 0.005$).

Sequence violation test: In the sequence violation test, we analysed RTs at the different positions of the FR (position 2-13) for violated and non-violated sequences (Figure 8 a,b,c). During non-violated stimulus presentation, all three groups showed a typical ratio run, as the RT decreased, especially during the 1st half of the FR ratios. During violated sequences, the curve patterns of the control- and lesion group were interrupted at the violated position, since the RT of both groups were significantly slower at the violated 9th position as compared to the preceding 8th position (control: $t_7 = -2.37$; $p = 0.05$; lesion: $t_{11} = -3.98$; $p = 0.02$). In the sham group such an effect

was not observed ($t_6 = -1.78$; $p = 0.13$). Comparing RTs of the 9th position between violated and non violated sequences revealed significantly longer violated RTs in the control and lesion groups (control: $t_7 = -3.84$; $p = 0.006$; lesion: $t_{11} = -4.67$; $p = 0.001$) but not in the sham group ($t_6 = -1.81$; $p = 0.119$). Statistical analyses of the 10th and 11th positions did not reveal statistical effects (p -values $> .05$).

When analysing the types of responses made in the violated positions (Figure 9), we found that the lesion group made 9.25 ± 0.54 correct pokes, 3.07 ± 0.42 expected errors, and 0.67 ± 0.35 random errors. The corresponding values were 7.75 ± 0.7 , 2.87 ± 0.29 , and 1.5 ± 0.45 for the control group, and 7.0 ± 1.12 , 2.13 ± 0.94 , and 1.7 ± 0.88 for the sham group. A 2 x 3 factor ANOVA with groups and response types as factors yielded a significant group difference ($F_{2;2} = 4.719$; $p = 0.019$), and a difference between response types ($F_{2;26} = 66.527$; $p > 0.001$), whereas the interaction between these factors was not significant ($F_{2;26} = 1.460$; $p = 0.229$).

Since the ANOVA revealed significant between-group differences, the patterns of the three groups were analysed separately by additional ANOVAs with response type as repeated measurement factor. The lesion group showed a significant response types effect ($F_{2;11} = 64.783$; $p < 0.001$), and post hoc tests revealed more correct pokes than random ($p < 0.001$) and expected errors ($p < 0.001$) and also more expected than random errors ($p = 0.005$). The response type effect was also significant for the sham group ($F_{2;6} = 6.388$, $p = 0.013$; but there, post hoc tests revealed no differences. Finally, the response type effect was also significant in controls ($F_{2;7} = 31.722$; $p < 0.001$), which made more correct pokes than random ($p = 0.02$) and expected errors ($p = 0.01$), whereas there was no difference between expected and random errors.

Basic Training: A major outcome of this study was that the lesion group unexpectedly showed a substantial enhancement in SRTT performance in terms of RT and accuracy, and this effect already occurred during the first days of the training period. To analyze whether such an effect might already have occurred prior to sequence training we also analysed the shaping phase *a-posteriori* to check if the groups showed different levels of performance already on a very early level of instrumental learning. Here, it is be noted that the criteria during shaping were enhanced according to the animal's individual performance. Thus, data of the shaping procedure could only be compared between groups on the first two days, since during these days all animals

were still on the level where only hole 3 was activated. On day 3, some animals already switched to the next holes, whereas others still had to learn to poke into hole 3. On shaping day 1, the lesion group made 18.58 ± 2.53 correct pokes and 28.33 ± 2.70 wrong pokes, as compared to 11.43 ± 2.74 correct and 24.71 ± 6.50 wrong pokes in shams, and 16.00 ± 1.50 correct and 22.00 ± 1.82 wrong pokes in controls. There was no significant difference between groups ($p > 0.05$; t-tests not shown). On shaping day 2, the lesion group showed superior performance as compared to shams and controls. In detail, the lesion group made 24.42 ± 4.92 correct pokes, which was significantly more than shams (10.00 ± 1.16 ; $t_{17} = 2.85$; $p = 0.014$) and controls (11.25 ± 1.95 ; $t_{18} = 2.488$; $p = 0.026$). There was no difference between groups in the number of incorrect pokes (lesion group: 38.33 ± 5.26 , shams: 30.14 ± 3.50 , controls: 26.38 ± 5.19 ; t-tests not shown).

In contrast, when comparing the number of overall shaping days between groups there was no difference (p -values $> .05$; tests not shown): The lesion group reached the FR 13 criterion after 6.1 ± 0.5 days, shams after 5.7 ± 0.4 days, and controls after 6.8 ± 0.5 days.

Food consumption test:

On the first test day, the animals were tested under food deprivation and the numbers of animals were determined which had consumed all available food pellets during three minutes of free access: lesion group: 7 (out of 12) sham group: 6 (out of 7); control group: 7 (out of 8). A Chi Square tests revealed no significant difference for this distribution ($p = 0.247$).

On the next day, the procedure was repeated in the non-deprived state. Now, 5 rats in the lesion group (out of 12); all sham rats, and 7 (out of 8) controls consumed all pellets. A Chi Square test revealed, that less subjects in the lesion group consumed all pellets during this test ($p = 0.012$).

Discussion

We tested the effects of dorsal hippocampal lesions in an instrumental SRTT model in which rats have to perform sequential choices on an FR 13 schedule in order to obtain food reinforcement. The lesions were placed before the instrumental training, so that we could test the effects of the lesions on task acquisition and also its outcomes using a so-called S-R-S-R test and a sequence violation test.

MRI analyses: MRI analyses revealed that the ibotenic acid lesion group had ablated almost the entire dorsal hippocampus, while sparing the ventral one. Shams had sustained only minor tissue reduction of 4-6%. Ablation site and extent in the lesion group are comparable to those of previous studies (Bast et al. 2009, de Hoz et al. 2003).

Place Object Recognition test: Prior to the SRTT training and testing, we tested our rats for spatial memory deficits in a place object recognition test. Regarding the three habituation days, the lesion group showed slightly enhanced activity in terms of travelled distance as compared to the control- and sham group. In the actual place object recognition test, all groups showed higher exploratory behaviour towards the moved object. Compared to controls, this preference towards the displaced object was reduced in shams and the lesion group. The observed reduced preference towards the moved object in the lesion group is in accordance with the literature on the place object recognition test and hence indicates that the lesions caused spatial memory deficits (Kart-Teke et al. 2006, Dere et al. 2006). Because the sham animals had no relevant hippocampal lesions, the observed deficits in spatial memory had not been expected for this group, but might be due to the fact that this group had sustained multiple intra-hippocampal injections, which might have also impaired its function (see also below).

SRTT: In the SRTT the lesion group unexpectedly showed superior performance as compared to shams and controls, and this effect was observed throughout the sequential tests. As indicated by the higher number of correct pokes on the second shaping day, superior performance already occurred at a very early stage of instrumental learning. This superior performance was also evident in terms of RT and accuracy during the training period. Regarding the results of the S-R-S-R test, the interference effect - indicated by a "saw tooth" shaped curve - was evident in the accuracy data in all groups. Like in a prior study, the interference effect was more pronounced (and only significant) in the accuracy data than in the RTs (Eckart et al. 2010b). Again, the lesion group showed the fastest RTs as compared to shams and controls and a higher accuracy than shams.

In the sequence violation test, both, lesion and control group showed an interruption in their ratio run in terms of significantly higher RTs at the violations on the 9th position of the FR as compared to the 8th position and to the non-violated 9th FR positions. The patterns of lesion- and control group are very similar to the patterns ob-

served in our previous SRTT experiments (Dorothee & Schwarting; 2007, 2008, Eckart et al. 2010a/b). This typical enhancement in RTs at the violated positions did not occur in shams.

Looking at the response types made at the violated positions, all groups mostly made correct pokes into the illuminated hole. The relevant difference is, that only the lesion group made significantly more pokes into the expected (but skipped hole) as compared to random errors. In shams and controls in contrast, there was no significant difference between the number of random and expected errors. According to our previous work (Domenger et al. 2008) the expected errors probably reflect highly automated sequential behaviour: since the stimulus presentation follows a second order sequence, the position of the skipped hole can only be predicted by several preceding sequential items, and not by simple stimulus-response learning. Hence the response type analyses of the sequence violation test indicate that the hippocampal lesions led to enhanced automated sequential behaviour.

As an open question however it remains, whether the lesions had a direct effect on sequential learning. An alternative explanation would be that the influence was indirect and based on superior instrumental learning in general. Here, it should also be pointed out that the lesion group completed the FR runs more often per training day than shams and controls, which means that they received more intensive sequential training than the other groups. This possible effect could be tested in future work by adjusting the numbers of FR runs between groups, rather than using specific training durations as applied here.

Food consumption test: As the lesion group did not differ in its food consumption as compared to shams and controls in the food deprived version of the drive test and showed even lower food consumption in the ad libitum version, it is unlikely that the superior performance of the lesion group can be explained by a higher hunger state and thus a higher motivation in the food reinforced SRTT.

Summing up, our results confirm the hippocampal lesions on a structural (hippocampal tissue loss in the MRI analyses) and on a behavioural level (reduced spatial memory in the place object recognition task). Remarkably these lesions led to a superior SRTT performance throughout shaping, training and testing in RT as compared to controls. While all groups showed the expected pattern of sequential learning in terms of an interference effect, only controls and lesion group showed RT in-

creases to violations of the learned sequential patterns whereas the lesion group reached the highest degree of automated sequential behaviour.

The sham lesions in contrast led to some deficits in spatial and sequential learning. This is most probably due to side effects caused by the surgery since behavioural and mnemonic deficits as well as neurochemical changes have repeatedly been reported in sham operated animals (Adams et al. 1993, Hirshler et al. 2010, Grossman et al. 2003, Rao et al. 1999). This makes the superior performance of the lesion group even more impressive, because this group also had to cope with all the general side effects caused by the present type of surgery. Nevertheless they even performed better than the control group, which had not been exposed to surgery at all.

It has to be pointed out, that the lesion group showed evidence for hyperactive behaviour – which is often observed in dorsal hippocampal lesioned rats (Godsil et al. 2005) – in terms of a slightly enhanced locomotor activity during the habituation phase of the place object recognition task. Thus, such hyperactivity might have influenced the performance in the SRTT; however, the lesion group showed no RT-accuracy trade-off as indicated by the non significant correlations between both variables, and a superior performance in both variables. These SRTT outcomes indicate, that the high performance level cannot simply be explained by hyperactivity.

Therefore, the question remains, which are the underlying mechanisms of the superior performance in the lesion group. Referring to a previous experiment, which revealed, that sequential learning as assessed by our rat SRTT is severely affected by dopaminergic lesions in the neostriatum (Eckart et al. 2010a), our results strongly support the hypotheses of a possible interference between striatum and hippocampus in some learning situations, as proposed by White and McDonald (2002) and Packard and Knowlton (2002). Both models propose that an interference between both structures may occur during striatal stimulus-response learning and hippocampal spatial learning.

White and McDonald proposed in their “multiple parallel memory theory”, that striatum and hippocampus both receive input from the sensory cortex and project to the prefrontal cortex, which may result in competitive functioning if striatum and hippocampus promote different behaviours. Packard and Knowlton state, that hippocampal learning is a very rapid form of learning, which is dominant during early stages of learning and is slowly overshadowed by procedural learning. Our data, however, suggest that hippocampal processes interfered throughout the entire SRTT training

and testing period. The lesion group already showed superior performance in terms of more correct pokes on shaping day 2 and a higher degree of automated sequential behaviour (as indicated by the expected errors in the sequence violation test), which was gradually acquired over the whole training period.

Findings of enhanced learning capacities after hippocampal lesions were also reported in experiments with rodents (Bussey et al. 1998, Wirth et al. 1998, Compton 2004) and monkeys (Moss et al. 1981, Zola & Mahut 1973, Kwok & Buckley 2009). Kwok and Buckley claimed that the hippocampus is crucial for spatial and temporal learning. In tests where spatial or temporal cues are irrelevant, hippocampal activity can interfere with other memory systems. Wirth et al. (1998) proposed that in simple associative learning and memory tasks hippocampal lesions may induce facilitations rather than deficits.

Also, there are some hints indicating that similar interference between striatum and hippocampus may also occur in humans. The results of an fMRI study of Foerde et al. (2006) showed that striatum and hippocampus may interfere in habit learning. Furthermore, a purely behavioural experiment of Howard and Howard (2001) revealed, that there may be an interference between implicit and explicit sequential artificial grammar learning in elder human subjects. Since the observed interference occurred in a sequential task, the results indicate, that striatal sequential learning may also interfere in humans with explicit hippocampus dependent memory functions.

Together, one possible explanation for the superior performance of the lesion group in the present study is that our rat SRTT requires only minor spatial requirements, but depends on simple S-R associations during the early phase of task acquisition, followed by sequential learning thereafter. In a similar rat SRTT, used by Christie & Dalrymple-Alford (2004) deficits in sequential learning were reported in striatal lesioned animals but preserved sequential learning in animals with dorsal hippocampal lesions. This test is also a 4-choice SRTT where stimulus presentation follows a 12 item sequence. But the stimuli were arranged horizontally – thus the distance between them and thus the spatial requirements were larger than in our rat SRTT. This might be an explanation, why they found a dissociation between hippocampal and striatal learning. Furthermore, in their experiment lesions were applied by means of radiofrequency (for disadvantages of radiofrequency lesions as compared to ibotenic acid lesions see Jarrard 2002), and the rats were rewarded by intracranial self-stimulation.

Taken together, we found a rather unexpected and very substantial effect, namely superior performance in hippocampal lesion animals in a quite complex task. We assume that our results indicate that there is a competition between striatal and hippocampal learning in tests which depend on procedural S-R and sequential learning with only minimal spatial requirements. Effects of enhanced procedural learning in hippocampal lesioned animals have been observed before, but to our knowledge such a long lasting effect has not been reported before, and especially the finding that hippocampal activity might interfere with sequential learning is a completely new result.

Acknowledgements:

We wish to thank Dipl.-Ing. Maximilian Völker and Dipl.-Ing. Kathrin Stelter for the MRI data acquisition, Florian Nies for the assistance during surgery, Dr. Andreas Borta for help with Biobserve, and Dr. Tobias Bast for the advices concerning the hippocampal lesions. This work was funded by the DFG graduate school “NeuroAct”

References

- Adams, F. S., Schwarting, R. K., & Huston, J. P. (1994). Behavioral and neurochemical asymmetries following unilateral trephination of the rat skull: is this control operation always appropriate? *Physiol Behav*, 55(5), 947-952.
- Albouy, G., Sterpenich, V., Baiteau, E., Vandewalle, G., Desseilles, M., Dang-Vu, T., et al. (2008). Both the hippocampus and striatum are involved in consolidation of motor sequence memory. *Neuron*, 58(2), 261-272.
- Badgaiyan, R. D., Fischman, A. J., & Alpert, N. M. (2007). Striatal dopamine release in sequential learning. *Neuroimage*, 38(3), 549-556.
- Bakshi, V. P., & Kelley, A. E. (1994). Sensitization and conditioning of feeding following multiple morphine microinjections into the nucleus accumbens. *Brain Res*, 648(2), 342-346.
- Bast, T., Wilson, I. A., Witter, M. P., & Morris, R. G. (2009). From rapid place learning to behavioral performance: a key role for the intermediate hippocampus. *PLoS Biol*, 7(4), e1000089.
- Bevins, R. A., & Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc*, 1(3), 1306-1311.
- Bussey, T. J., Clea Warburton, E., Aggleton, J. P., & Muir, J. L. (1998). Fornix lesions can facilitate acquisition of the transverse patterning task: a challenge for "configural" theories of hippocampal function. *J Neurosci*, 18(4), 1622-1631.
- Christie, M. A., & Dalrymple-Alford, J. C. (2004). A new rat model of the human serial reaction time task: contrasting effects of caudate and hippocampal lesions. *J Neurosci*, 24(5), 1034-1039.
- Compton, D. M. (2004). Behavior strategy learning in rat: effects of lesions of the dorsal striatum or dorsal hippocampus. *Behav Processes*, 67(3), 335-342.
- Da Cunha, C., Wietzikoski, E. C., Dombrowski, P., Bortolanza, M., Santos, L. M., Boschen, S. L., et al. (2009). Learning processing in the basal ganglia: a mosaic of broken mirrors. *Behav Brain Res*, 199(1), 157-170.
- Davidson, T. L., Kanoski, S. E., Chan, K., Clegg, D. J., Benoit, S. C., & Jarrard, L. E. (2010). Hippocampal lesions impair retention of discriminative responding based on energy state cues. *Behav Neurosci*, 124(1), 97-105.
- de Hoz, L., Knox, J., & Morris, R. G. (2003). Longitudinal axis of the hippocampus: both septal and temporal poles of the hippocampus support water maze spatial learning depending on the training protocol. *Hippocampus*, 13(5), 587-603.
- Dere, E., Kart-Teke, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2006). The case for episodic memory in animals. *Neurosci Biobehav Rev*, 30(8), 1206-1224.
- Domenger, D., & Schwarting, R. K. (2005). Sequential behavior in the rat: a new model using food-reinforced instrumental behavior. *Behav Brain Res*, 160(2), 197-207.
- Domenger, D., & Schwarting, R. K. (2006). The serial reaction time task in the rat: effects of D1 and D2 dopamine-receptor antagonists. *Behav Brain Res*, 175(2), 212-222.
- Domenger, D., & Schwarting, R. K. (2007). Sequential behavior in the rat: role of skill and attention. *Exp Brain Res*, 182(2), 223-231.
- Domenger, D., & Schwarting, R. K. (2008). Effects of neostriatal 6-OHDA lesion on performance in a rat sequential reaction time task. *Neurosci Lett*, 444(3), 212-216.
- Doyon, J., Ungerleider, L. G. (2002). Functional Anatomy of Motor Skill Learning. In L. R. Squire, Schachter, D.L. (Ed.), *Neuropsychology of Memory* (pp. 225-238). New York: Guilford.

- Eckart, M. T., Huelse-Matia, M. C., McDonald, R. S., & Schwarting, R. K. (2010a). 6-hydroxydopamine lesions in the rat neostriatum impair sequential learning in a serial reaction time task. *Neurotox Res*, 17(3), 287-298.
- Eckart, M. T., Huelse-Matia, M. C., Loer, D., & Schwarting, R. K. (2010b). Acquisition and performance in a rat sequential reaction time task is not affected by subtotal ventral striatal 6-OHDA lesions. *Neurosci Lett*, 476, 21-31.
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1), 7-19.
- Ferraro, F. R., Balota, D. A., & Connor, L. T. (1993). Implicit memory and the formation of new associations in nondemented Parkinson's disease individuals and individuals with senile dementia of the Alzheimer type: a serial reaction time (SRT) investigation. *Brain Cogn*, 21(2), 163-180.
- Foerde, K., Knowlton, B. J., & Poldrack, R. A. (2006). Modulation of competing memory systems by distraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(31), 11778-11783.
- Gheysen, F., Van Opstal, F., Roggeman, C., Van Waelvelde, H., & Fias, W. (2010). Hippocampal contribution to early and later stages of implicit motor sequence learning. *Exp Brain Res*, 202(4), 795-807.
- Godsil, B. P., Stefanacci, L., & Fanselow, M. S. (2005). Bright light suppresses hyperactivity induced by excitotoxic dorsal hippocampus lesions in the rat. *Behav Neurosci*, 119(5), 1339-1352.
- Graybiel, A. M. (1998). The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiol Learn Mem*, 70(1-2), 119-136.
- Grossman, R., Shohami, E., Alexandrovich, A., Yatsiv, I., Kloog, Y., & Biegon, A. (2003). Increase in peripheral benzodiazepine receptors and loss of glutamate NMDA receptors in a mouse model of closed head injury: a quantitative autoradiographic study. *Neuroimage*, 20(4), 1971-1981.
- Hirshler, Y. K., Polat, U., & Biegon, A. (2010). Intracranial electrode implantation produces regional neuroinflammation and memory deficits in rats. *Exp Neurol*, 222(1), 42-50.
- Hopkins, R. O., Waldram, K., & Kesner, R. P. (2004). Sequences assessed by declarative and procedural tests of memory in amnesic patients with hippocampal damage. *Neuropsychologia*, 42(14), 1877-1886.
- Howard, D. V., & Howard, J. H., Jr. (2001). When it does hurt to try: adult age differences in the effects of instructions on implicit pattern learning. *Psychon Bull Rev*, 8(4), 798-805.
- Jarrard, L. E. (2002). Use of excitotoxins to lesion the hippocampus: update. *Hippocampus*, 12(3), 405-414.
- Kart-Teke, E., De Souza Silva, M. A., Huston, J. P., & Dere, E. (2006). Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiol Learn Mem*, 85(2), 173-182.
- Kwok, S. C., & Buckley, M. J. (2009). Fornix transected macaques make fewer perseverative errors than controls during the early stages of learning conditional visuospatial discriminations. *Behav Brain Res*, 205(1), 207-213.
- Lee, T., Jarome, T., Li, S. J., Kim, J. J., & Helmstetter, F. J. (2009). Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal magnetic resonance imaging study. *Neuroreport*, 20(17), 1554-1558.
- Morris, R. G. (2007). Theories on Hippocampal Function. In Anderson, Morris, Amaral, Bliss & O'Keefe (Ed.), *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press.

- Moss, M., Mahut, H., & Zola-Morgan, S. (1981). Concurrent discrimination learning of monkeys after hippocampal, entorhinal, or fornix lesions. *J Neurosci*, 1(3), 227-240.
- Nagy, H., Keri, S., Myers, C. E., Benedek, G., Shohamy, D., & Gluck, M. A. (2007). Cognitive sequence learning in Parkinson's disease and amnesic mild cognitive impairment: Dissociation between sequential and non-sequential learning of associations. *Neuropsychologia*, 45(7), 1386-1392.
- Nissen, M. J., Bullemer, P. (1987). Attentional Requirements of Learning: Evidence from Performance Measures. *Cognitive Psychology*, 19, 1-32.
- Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci*, 25, 563-593.
- Paxinos, G. W., C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Vol. 6): Elsevier.
- Rao V.L., D. A., Bowen K.K., Dempsey R.J. (2000). Traumatic brain injury leads to increased expression of peripheral-type benzodiazepine receptors, neuronal death, and activation of astrocytes and microglia in rat thalamus. *Experimental Neurology*, 161, 102-114.
- Reed, J., Johnson, P. (1994). Assessing Implicit Learning With Indirect Tests: Determining What Is Learned About Sequence Structure. *J Exp Psych: Learning Memory Cogn*, 20(3), 585-594.
- Schendan, H. E., Searl, M. M., Melrose, R. J., & Stern, C. E. (2003). An fMRI study of the role of the medial temporal lobe in implicit and explicit sequence learning. *Neuron*, 37(6), 1013-1025.
- Schwartz, R. K. (2009). Rodent models of serial reaction time tasks and their implementation in neurobiological research. *Behav Brain Res*, 199(1), 76-88.
- Siebert, R. J., Taylor, K. D., Weatherall, M., & Abernethy, D. A. (2006). Is implicit sequence learning impaired in Parkinson's disease? A meta-analysis. *Neuropsychology*, 20(4), 490-495.
- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev*, 99(2), 195-231.
- Werheid, K., Ziessler, M., Nattkemper, D., & Yves von Cramon, D. (2003). Sequence learning in Parkinson's disease: the effect of spatial stimulus-response compatibility. *Brain Cogn*, 52(2), 239-249.
- White, N. M., & McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem*, 77(2), 125-184.
- Wirth, S., Ferry, B., & Di Scala, G. (1998). Facilitation of olfactory recognition by lateral entorhinal cortex lesion in rats. *Behav Brain Res*, 91(1-2), 49-59.
- Zola, S. M., & Mahut, H. (1973). Paradoxical facilitation of object reversal learning after transection of the fornix in monkeys. *Neuropsychologia*, 11(3), 271-284.

Table 1:

Injection coordinated adopted from Bast et al. (2009)

AP (mm)	ML (mm)	V (mm from dura)	Volume (µl)
- 2,4	+/- 1,0	- 3,2	0,05
- 3	+/- 3,0	- 2,9	0,1
	+/- 1,4	- 2,3	0,05
		- 3,1	0,05
- 4	+/- 3,7	- 2,7	0,1
	+/- 2,6	- 2,0	0,05
		- 3,0	0,05
- 5	+/- 5,	- 4,	0,05
	+/- 3,9	- 3,1	0,05

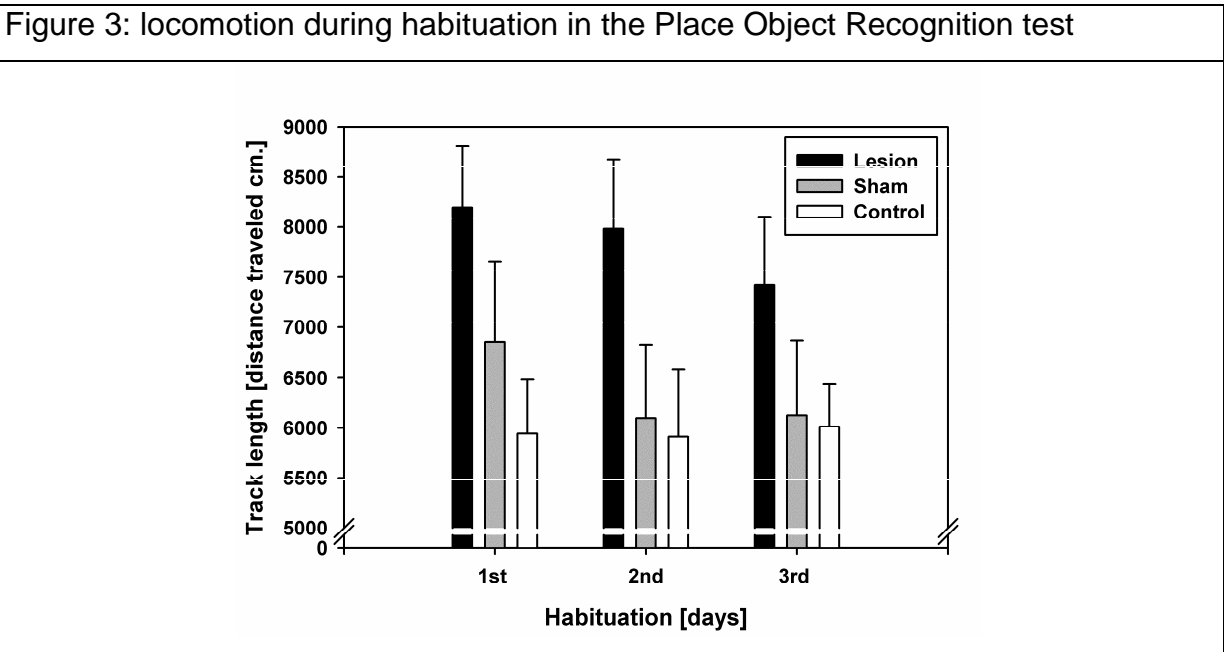
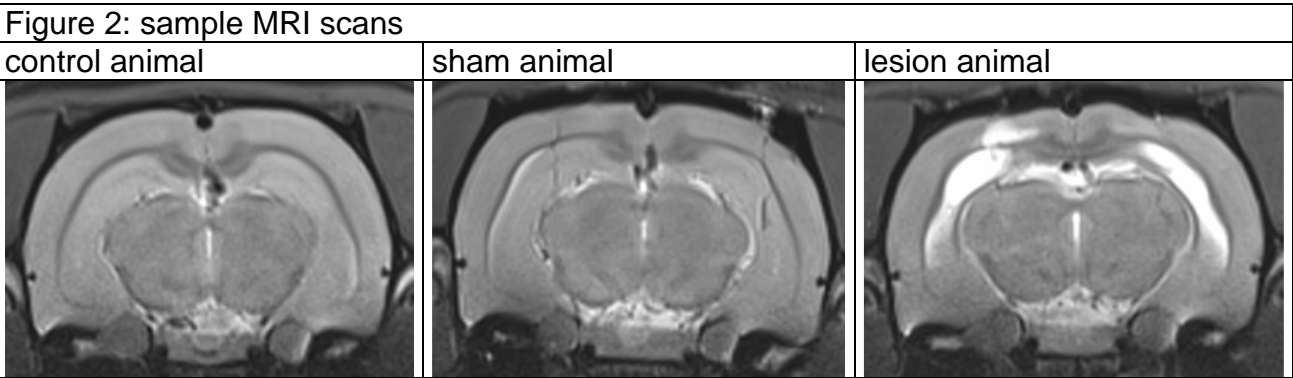
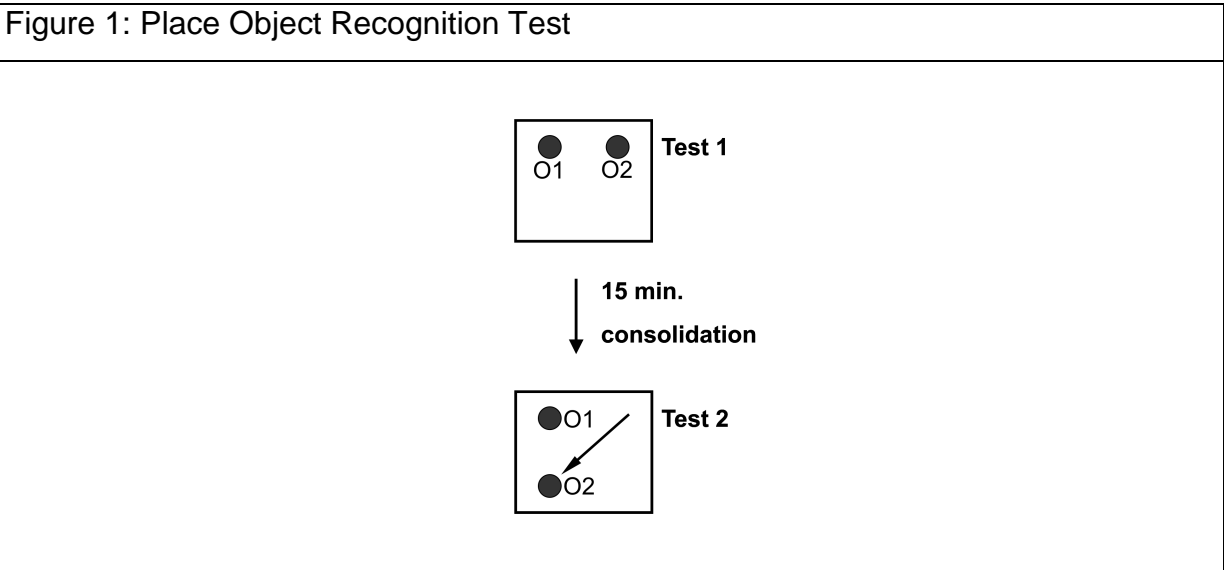


Figure 4: Place Object Recognition: discrimination ratio; values above 0.5 indicate a preference towards the moved object, the chance discrimination ratio is indicated by the dashed line.

§: $p < 0.05$ (between groups)

** : $p < 0.01$ (as compared to chance)

* : $p < 0.05$ (as compared to chance)

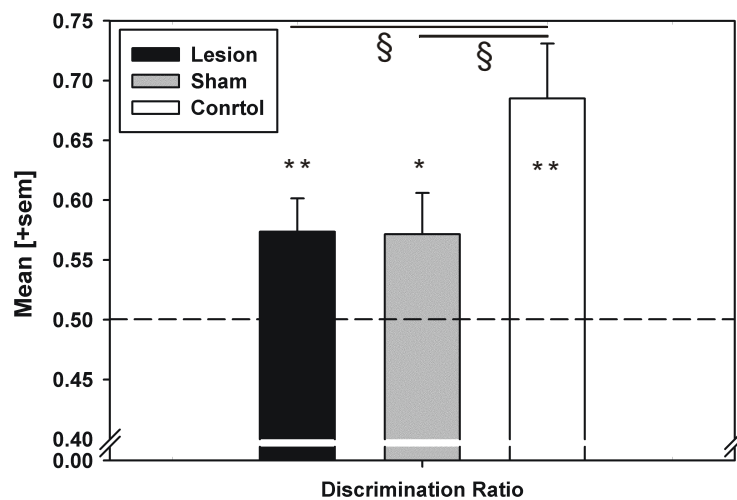


Figure 5: RTs during training period

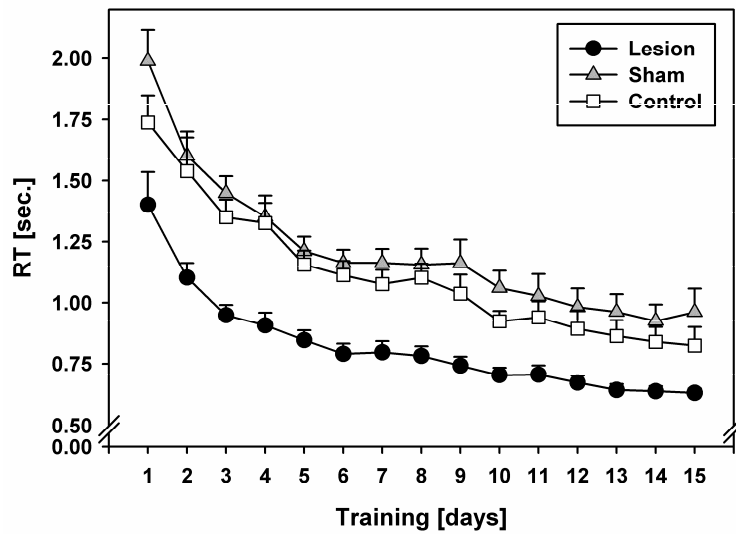


Figure 6: accuracy (acc.) during training period

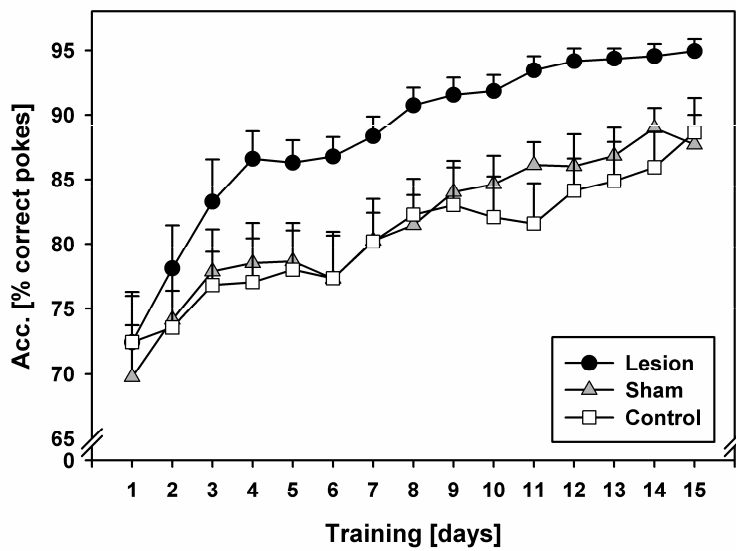


Figure 7: accuracy (acc.) S-R-S-R test

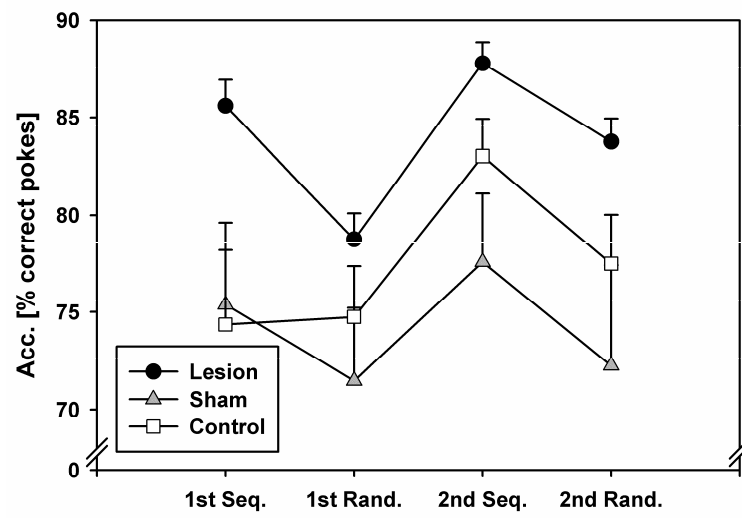
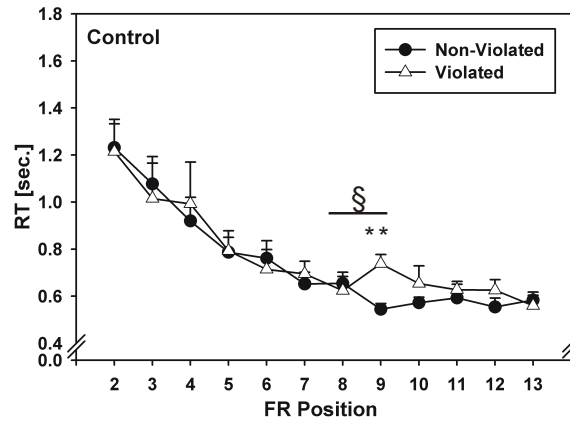


Figure 8: Sequence Violation Test RT; a: controls; b: sham, c: lesion

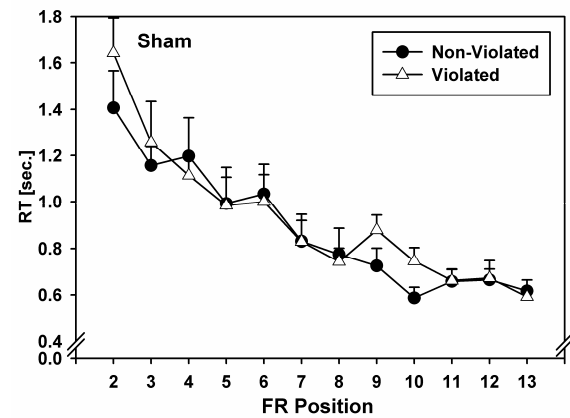
§: violated pos. 8 vs. violated pos. 9 $p < 0.05$

** : violated pos. 9 vs. non violated pos. 9 $p < 0.01$

a)



b)



c)

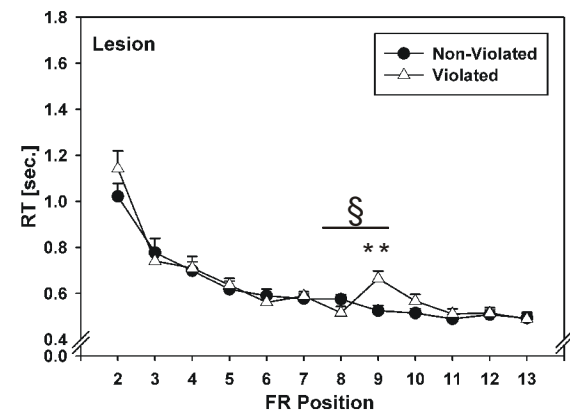
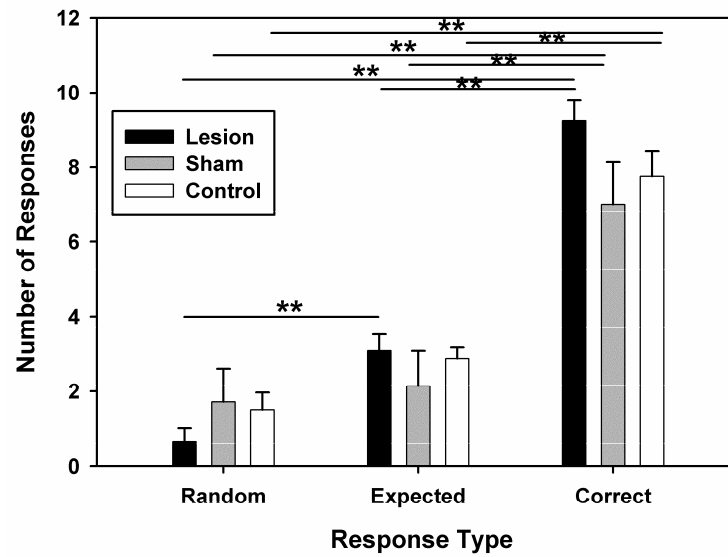


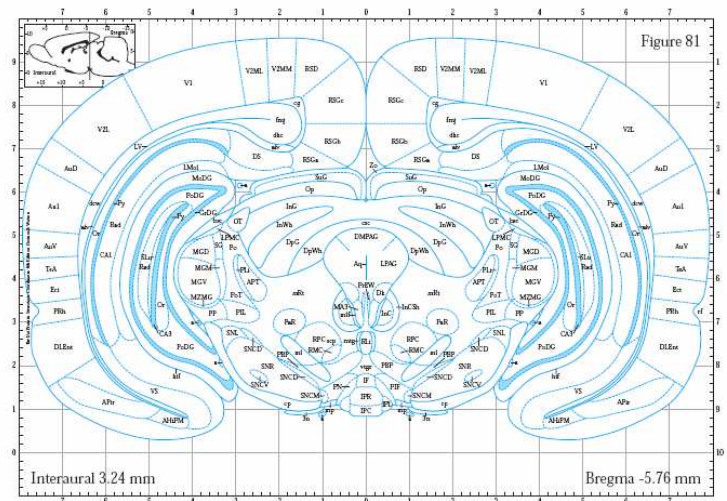
Figure 9: Sequence Violation Test; response types at the violated positions

** : $p < 0.001$



PUBLIKATIONEN

DISKUSSION



7. DISKUSSION

DISKUSSION

7.1. SEQUENTIELLES LERNEN UND STRIATALE DOPAMINERGE PROZESSE (STUDIE I & II)

7.1.1. STUDIE I

Die neostriatal dopaminerg lädierten Tiere zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Interferenzeffekt im „S-R-S-R Test“ in ihren Reaktionszeiten und einen reduzierten Interferenzeffekt in ihrer Genauigkeit. Auch im „Sequence Violation Test“ zeigten sich bei den lädierten Tieren keine Auswirkungen der Fehler in der Sequenz auf die Reaktionszeiten. Die Kontrollgruppe hingegen zeigte signifikante Verlangsamungen an den fehlerhaften Stellen. Zudem machte die Kontrollgruppe mehr „erwartete Fehler“, was auf einen höheren Grad an Automatisierung sequentiellen Verhaltens schließen lässt. Die Läsionen führten somit zu einer deutlichen Reduzierung (nicht aber zu einer kompletten Unterbindung) sequentiellen Lernens. Ein kompletter Ausfall sequentiellen Lernens bei den lädierten Tieren ist aufgrund der subtotalen dopaminergen Läsionen nicht erwartet worden.

Aufgrund der Ergebnisse einer vorherigen Studie, in der dopaminerge Läsionen im Striatum nur geringen Einfluss auf Performanz zuvor gelernter Sequenzen hatten (Domenger & Schwarting 2008, siehe Abschnitt 3.4.5.)¹⁷ wurde die Hypothese aufgestellt, dass striatale dopaminerge Prozesse eher eine Rolle beim sequentiellen Lernen als beim Ausführen bereits gelernter Sequenzen spielen. Die Ergebnisse aus STUDIE I stützen diese Annahme. Darüber hinaus sind die Ergebnisse konform mit der Annahme von Packard und Knowlton (2002), dass das mediale Neostriatum eine zentrale Rolle beim sequentiellen Lernen spielt.

7.1.2. STUDIE II

Die Ergebnisse aus STUDIE II stützen die Hypothese, dass dopaminerge Läsionen im ventralen Striatum keinen Einfluss auf sequentielles Lernen haben. Die lädierten Tiere zeigten in ihrem sequentiellen Lernen (Interferenzeffekt und Automatisierung sequentiellen Verhaltens) keine Unterschiede zur Kontrollgruppe. Aufgrund der subtotalen Läsionen ist an dieser Stelle einschränkend zu sagen, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich bei stärkeren Läsionen Effekte auf sequentielles Lernen gezeigt hätten.

Die Annahme, dass der Nucleus accumbens (oder allgemeiner das ventrale Striatum) mit Stimulus-Belohnungslernen (Packard & Knowlton 2002) oder generell klassischer und instrumenteller Konditionierung (Alcaro et al. 2007) assoziiert ist, wird indirekt durch STUDIE II gestützt, da es signifikant länger dauerte, bis die lädierten Tiere das FR-13-Niveau erreich-

¹⁷ Diese Studie wird unter 3.4.5 ausführlich vorgestellt.

ten (Shaping-Tage). Einschränkend ist hier zum einen anzumerken, dass der Unterschied in den Shaping-Tagen zwar statistisch signifikant ist, in absoluten Werten jedoch gering (im Durchschnitt etwa ein Tag). Zweitens läuft das Shaping im Gegensatz zum sequentiellen Training und den Tests nicht rein computergesteuert ab und ist daher anfällig für Versuchsleitereffekte¹⁸.

7.1.3. MODELL FÜR DIE ROLLE DOPAMINERGER STRIATALER PROZESSE IM SEQUENTIELLEN LERNEN DER RATTE

Als Integration der Befunde aus STUDIE I und II über die Rollen des ventralen Striatums und des Neostriatums der Ratte im sequentiellen Lernen bietet sich ein hierarchisches Modell an. Das ventrale Striatum spielt hiernach eine wichtige Rolle im instrumentellen Konditionieren – also konkret in dem angewendeten Ratten-SRTT zu lernen, auf visuelle Stimuli mit Nose-Pokes zu reagieren und dieses Verhalten bis auf FR 13 zu steigern.

Dieses instrumentelle Konditionieren ist eine notwendige Voraussetzung für das Erlernen der sequentiellen Ordnung, die der Reizdarbietung zugrunde liegt, sowie der Automatisierung sequentiellen Verhaltens während der Trainingsphase.

Die Funktion des sequentiellen Lernens wird vom Neostriatum übernommen und funktioniert unabhängig von ventralen striatalen dopaminergen Prozessen, weshalb sich bei ventralen striatalen dopaminergen Läsionen isolierte Defizite im instrumentellen Konditionieren zeigten, nicht aber im sequentiellen Lernen.

Da keine korrelativen Zusammenhänge zwischen sequentiellem Lernen und dopaminergen Läsionen gefunden wurden¹⁹, bietet sich ein Schwellenmodell an. Die vorgefundenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die dopaminergen Verluste im medialen Neostriatum einen Schwellenwert von ca. 50% überschritten haben müssen, um einen Einfluss auf sequentielles Lernen zu haben. Dies wäre auch im Einklang mit Befunden aus dem Humanbereich, da z.B. bei Parkinson ebenfalls Schwellenmodelle für die Entwicklung der Parkinsonsymptomatik vorgeschlagen werden (siehe hierzu z.B. Braak et al. 2004, Braak et al. 2006).

Instrumentelles Lernen wird spätestens ab einer unilateralen dopaminergen striatalen Läsion von über 90% unmöglich. Diese Annahme stützt sich allerdings lediglich auf die Beobachtungen an einem einzelnen Tier in STUDIE II, das besonders starke Läsionen in einer He-

¹⁸ Z.B. ist davon auszugehen, dass sich während des shapings um die Tiere, die langsamer lernen, intensiver gekümmert wird.

¹⁹ Die nicht signifikanten Korrelationen zwischen striatalem Dopamin und SRTT Leistung sind nicht in den Publikationen enthalten.

DISKUSSION

misphäre aufwies und aus der Studie ausgeschlossen werden musste, da sich trotz intensiver Bemühungen keine Fortschritte in der Shaping-Phase zeigten.

Die Annahme von zwei unterschiedlichen Mechanismen für instrumentelles und sequentielles Lernen deckt sich mit dem Modell von Graybiel (1998), die vorschlägt, dass – aufbauend auf S-R-Lernen – Repräsentationen von motorischen und kognitiven Aktionen als sequentielle Ausführungseinheiten [performance units] zusammengefasst werden (siehe hierzu auch 3.1.4.).

7.1.4. KLINISCHE IMPLIKATIONEN AUS STUDIE I & II

6-OHDA-Läsionen im Striatum der Ratte – wie sie in STUDIE I und II zur Anwendung kamen – sind ein gängiges Tiermodell für frühe Phasen der Parkinsonerkrankung (Branchi et. al 2008). Somit stützen die vorliegenden tierexperimentellen Ergebnisse die Annahme von Owen (2004), dass Defizite im impliziten/prozeduralen Lernen bei Parkinson schon in präsymptomatischen Phasen auftreten können. Ausgehend von diesen Befunden wäre es im klinischen Bereich sinnvoll zu untersuchen, ob SRTT-Befunde tauglich sind, um eine Früherkennung von Parkinson zu ermöglichen. Damit eine solche Untersuchung diskriminativ gegenüber anderen Erkrankungen ist, bei denen ebenfalls Defizite im impliziten/prozeduralen Gedächtnis auftreten (z.B. Schizophrenie oder Huntington, siehe Einleitung), müsste eine Testbatterie entwickelt werden, die auf mehrere Frühsymptome der Parkinsonerkrankung abzielt. Weitere nichtmotorische Parkinsonsymptome, die den motorischen Symptomen vorausgehen können, sind nach Schulz (2007) Obstipation, Riechstörungen, REM-Schlafstörungen, Depression und exzessive Tagesmüdigkeit.

7.2. SEQUENTIELLES LERNEN UND DORSALER HIPPOCAMPUS (STUDIE III)

7.2.1. STUDIE III

In STUDIE III wurden Ratten dorsal hippocampal lädiert. Die Läsionen wurden sowohl neuroanatomisch (MRT) als auch auf der Verhaltensebene (Defizite im räumlichen Lernen im Platz-Objekt-Wiedererkennungstest) validiert.

Im SRTT zeigten sich deutliche Leistungsvorteile bei dorsal hippocampal lädierten Ratten. Diese verbesserte Leistung deutet sich bereits am zweiten Tag im instrumentellen Konditionieren in der Shaping-Phase an (Hier ist auch wieder anzumerken, dass diese Phase stark von Versuchsleitereffekten beeinflusst sein kann) und dauerten über die gesamte SRTT-Trainings- und Testungsphase an. Die höhere Anzahl an „erwarteten Fehlern“ im „Sequence Violation Test“ deutet darauf hin, dass die lädierten Tiere im Verlauf der Trainingsphase das sequentielle Verhalten stärker automatisierten. Wie bereits unter Punkt 5.3. ausgeführt, lässt dieses Ergebnis keine eindeutigen Schlüsse zu, ob die hippocampalen Läsionen einen direkten Einfluss auf sequentielles Lernen hatten oder einen indirekten über verbesserte S-R-Lernleistungen. In der Habituationsphase des Platz-Objekt-Wiedererkennungstests zeigten die lädierten Tiere eine erhöhte lokomotorische Aktivität, was auf Hyperaktivität schließen lässt. Da die lädierten Tiere sowohl in ihren Reaktionszeiten als auch in der Genauigkeit überlegen waren, kann hyperaktives Verhalten als Grund für die Leistungsvorteile ausgeschlossen werden.

7.2.2. WEITERE STUDIEN, IN DENEN SICH VERBESSERTE LEISTUNGEN NACH HIPPOCAMPALLEN LÄSIONEN ZEIGTEN

Leistungsverbesserungen nach Hippocampus-Läsionen (oder von Arealen, die funktionell eng mit dem Hippocampus verknüpft sind) wurden – wenn auch nur selten – schon in anderen Experimenten beobachtet.

Kwok & Buckley (2009), die erhöhte Lernerfolge bei fornixlädierten²⁰ Rhesusaffen in einer Aufgabe zum assoziativen Lernen fanden (visuovisual conditional association learning), postulierten, dass sich die Rolle der Fornix auf räumliches und zeitliches Lernen beschränkt und es zu Interferenzen bei Tests kommen kann, in denen zeitliche und räumliche Informationen irrelevant sind.

Bussey et al. (1998), die bei fornixlädierten Ratten ebenfalls verbesserte Lernleistungen in einer Aufgabe zum assoziativen Lernen fanden (transverse patterning task), erklärten

²⁰ Da in der Fornix nahezu alle Efferenzen des Hippocampus verlaufen, ist eine Fornixläsion mit einer kompletten Hippocampektomie, also einer funktionellen Abtrennung des Hippocampus, vergleichbar.

DISKUSSION

ihre Ergebnisse damit, dass eine doppelte Dissoziation zwischen räumlichem (hippocampalem) und einem nicht näher beschriebenen konkurrierenden konfiguralen Gedächtnissystem besteht. Beide Studien widersprechen in ihrer Diskussion der Theorie, dass der Hippocampus allgemein mit relationalem oder assoziativem Lernen assoziiert ist.

In einer Studie von Wirth et al. (1998) zeigten Ratten mit Läsionen des entorhinalen Kortex (der gemeinsam mit dem Hippocampus eine wichtige Rolle in der räumlichen und zeitlichen Orientierung sowie dem deklarativen Gedächtnis spielt) eine erhöhte Gedächtnisleistung in der Geruchswiedererkennung. Wirth et al. interpretieren die Ergebnisse dahingehend, dass Läsionen des entorhinalen Kortex die Leistung in simplen assoziativen Lern- und Gedächtnistests verbessern können.

Lee et al. (2008) und Gallagher und Holland (1992) fanden bei hippocampal lädierten Nagern (Lee et al. Mäuse, Gallagher und Holland Ratten) verbesserte Leistungen im S-R-Lernen im Morris-Watermaze („cued version“) bei gleichzeitigen Defiziten im räumlichen Lernen („spatial version“). McDonald und White (1994) fanden ebenfalls Leistungsvorteile im S-R-Lernen bei fornixlädierten Ratten.

Weitere Befunde, in denen Fornix- oder Hippocampusläsionen zu Leistungssteigerungen bei nichtmenschlichen Primaten führten, finden sich bei Moss et al. (1981) und Zoale und Mahut (1973).

Zusammenfassend lässt sich zu den oben aufgeführten Experimenten feststellen, dass Leistungssteigerungen nach hippocampalen, Fornix oder entorhinalen Kortex-Läsionen in Tests zum assoziativen Lernen auftreten können, in denen räumliche Informationen keine Rolle spielen. Aussagen darüber, mit welchen Hirnstrukturen der Hippocampus interferiert, werden von den AutorInnen jedoch nicht getroffen (einzige Ausnahme: Lee et al. 2008 und McDonald & White 1994, siehe 3.5).

7.3. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION VON STUDIE I, II UND III

In STUDIE I und II konnte gezeigt werden, dass die Leistung im instrumentellen Konditionieren von ventrostriatalen dopaminergen Prozessen abhängt (STUDIE II), das sequentielle Lernen hingegen von neostriatalen dopaminergen Prozessen (STUDIE I). Bei hippocampal lädierten Tieren hingegen waren Leistungssteigerungen beobachtbar (STUDIE III). Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass in dem angewendeten SRTT eine Interferenz zwischen hippocampalem und striatalem Lernen besteht. Dies deckt sich mit der Annahme von Packard und Knowlton (2002), dass es bei Lernvorgängen, bei denen das Striatum eine wichtige Rolle spielt, nach hippocampalen Läsionen zu einer Leistungssteigerung kommen kann. Explizit äußern Packard und Knowlton bezüglich einer Radiallabyrinthaufgabe zum S-R-Lernen „...IT IS CONCEIVABLE THAT SPATIAL INFORMATION PROCESSED BY THE SYSTEM [...] MAY INTERFERE WITH TASK REQUIREMENTS“. Auch die Ergebnisse der oben zitierten Studien über Leistungssteigerungen nach hippocampalen Läsionen sowie die Studien von Lee et al. (2008, siehe 3.5.) oder Gallagher und Holland (1992) passen zu dieser Annahme von Packard und Knowlton.

Darüber hinaus deuten die Ergebnisse aus STUDIE III allerdings darauf hin, dass nicht nur einfaches S-R-Lernen nach hippocampalen Läsionen erleichtert wird (diese Annahme wird durch die erhöhte Anzahl an richtigen Pokes an Shapingtag 2 bei den lädierten Tieren unterstützt), sondern auch die Akquisition von Aktionssequenzen und somit die graduelle Automatisierung sequentiellen Verhaltens (Graybiel 1998, zur Rolle der Basalganglien speziell im sequentiellen Lernen siehe auch Mink 1999). Dies zeigt sich in der erhöhten Anzahl an erwarteten Fehlern bei den lädierten Tieren im „Sequence Violation Test“. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die lädierten Tiere im Vergleich zu den anderen Gruppen im Verlauf der Trainingsphase einen höheren Automatisierungsgrad sequentiellen Verhaltens erreichten.

Anzumerken ist hier, dass es nach Packard und Knowlton (2002) – im Gegensatz zu Graybiel (1998) – keine Abgrenzung zwischen striatalen Mechanismen im S-R- und sequentiellen Lernen gibt. Nach Packard und Knowlton werden im medialen Neostriatum die S-R-Komponenten sequentiellen Lernens kodiert, nach Graybiel Chunks gebildet. Als alternative Interpretation der Ergebnisse von STUDIE III würde dies bedeuten, dass die verbesserte Leistung der hippocampal lädierten Tiere allein auf Verbesserungen im S-R-Lernen zurückzuführen sind, die nur indirekt einen Einfluss auf das sequentielle Lernen haben, da dieses auf S-R-Assoziationen aufbaut, was durch die Ergebnisse von STUDIE III nicht ausgeschlossen werden kann (siehe 5.3. oder 7.2.1).

7.4. NEUROANATOMISCHES ERKLÄRUNGSMODELL FÜR DIE BEOBACHTETEN INTERFERENZEN ZWISCHEN HIPPOCAMPUS UND STRIATUM

7.4.1. ERKLÄRUNGSMODELL

Eine mögliche Erklärung für Interferenzen zwischen Striatum und Hippocampus im sequentiellen Lernen ergibt sich daraus, dass sowohl das Striatum (Graybiel 1991, 1998, 2005, Stocco et al. 2010, Kandel et al. 2000, White & McDonald 2002, McDonald 1992, Beiser & Houk 1998) als auch der Hippocampus (Fanselow & Dong 2010, Bast 2007, White & McDonald 2002) in den präfrontalen Kortex projizieren, welcher als zentrale Exekutive arbeitet.

In „The Rat Nervous System“ von Paxinos (2004) werden sowohl striatale (Gerfen 2004) als auch hippocampale (Witter & Amaral 2004) Projektionen in den frontalen Kortex beschrieben.

Nach Graybiel (1991, 1998, 2005) und Stocco et al. (2010) projiziert das Striatum (via mediales Pallidumsegment / Thalamus²¹) zu den motorischen und kognitiven Systemen [motor and cognitive action systems] des frontalen Kortex sowie zu prämotorischen Regionen des Hirnstamms.

Stocco et al. (2010) beschreiben darüber hinaus – Bezug nehmend auf das „computational model“ von Berns und Sejnowski (1998) – dass die Basalganglien über den bewegungshemmenden indirekten Pfad (Striatum / laterales Pallidumsegment / Nucleus subthalamicus / mediales Pallidumsegment, siehe Trepel 2004) die Repräsentation einer Aktion speichern, wodurch diese mit nachfolgenden Aktionen zu zusammenhängenden sequentiellen Operationen assoziiert werden können.

Nach Kandel et al. (2000) projizieren die Basalganglien über einen Basalganglien-thalamokortikalen Schaltkreis u.a. in den dorsolateralen präfrontalen und lateralen orbitofrontalen Kortex (daneben auch Areale des motorischen und limbischen Kortex), wobei diese Projektionen die Bewegungsinitiation erleichtern. Hervorzuheben hierbei ist, dass nach dem Modell von Beiser und Houk (1998) eben diese striatalen Projektionen in den präfrontalen Kortex bei sequentiellen Lernen eine zentrale Rolle spielen.

Nach Bast (2007) verlaufen die Projektionen des dorsalen Hippocampus in den präfrontalen Kortex indirekt via eines intrahippocampalen septotemporalen Netzwerks, dass eine zentrale Rolle bei der Übersetzung von hippocampalen Gedächtnisfunktionen in adaptives Verhalten spielt – also der Verhaltenssteuerung aufgrund von zuvor erlernten Regeln und

²¹ Diese Verbindung wird i.d.R. als „direkter Pfad“ beschrieben und ist mit Bewegungsinitiation assoziiert (Trepel 2004).

DISKUSSION

Umwelthinformationen. Der präfrontale Kortex wiederum verknüpft den Hippocampus mit Hirnstammregionen, die für die Ausführung motorischer Reaktionen relevant sind.

White und McDonald (2002) beschreiben in ihrem Modell der multiplen parallelen Gedächtnissysteme [multiple parallel memory systems] ebenfalls eine parallele Projektion beider Gedächtnissysteme – Striatum und Hippocampus²² – in den präfrontalen Kortex, wobei die Interaktion sowohl kompetitiv als auch kooperativ sein kann, je nach dem, ob durch die parallele Aktivierung unterschiedliche oder ähnliche Verhaltensmuster ausgelöst werden. Die Autoren heben zudem hervor, dass beide Systeme nicht nur parallel in den präfrontalen Kortex projizieren, sondern zudem beide Afferenzen aus den sensorischen kortikalen Arealen erhalten und somit vermutlich dieselben Informationen verarbeiten. McDonald (1992) betont hierbei, dass gerade das mediale dorsale Striatum (also die Struktur, die mit sequentiellern Lernen assoziiert ist, siehe Packard & Knowlton 2002 oder STUDIE I) mit dem präfrontalen Kortex verknüpft ist.

Zusammenfassend bietet sich aufgrund der zuvor zitierten Modelle und neuroanatomischen Befunde folgendes Modell an: In Aufgaben, bei denen hippocampale Informationen irrelevant sind, können hippocampale Läsionen Leistungssteigerungen bei Tests zur Folge haben, die von striatalen Mechanismen abhängen, da der frontale Kortex keine Ressourcen aufbringen muss, um die irrelevanten hippocampalen Informationen zu verarbeiten. Die Ergebnisse aus STUDIE III deuten darüber hinaus darauf hin, dass eine solche Interferenz nicht nur bei S-R-Aufgaben (wie z.B. bei Packard & Knowlton 2002 oder McDonald & White 2002 beschrieben) besteht, sondern vermutlich auch bei dem komplexeren sequentiellen Lernen.

7.4.2. ALTERNATIVE ERKLÄRUNGEN

Nach Fanselow und Dong (2007) projiziert der Hippocampus via Subiculum und medialem entorhinalem Kortex in das Striatum, was ebenfalls Interferenzen zwischen Hippocampus und Striatum erklären könnte. Diese Verbindung wird allerdings mit Explorationsverhalten und Nahrungssuche [foraging behavior] assoziiert und lässt sich daher nur schwer mit der beobachteten Interferenz beim prozeduralen Lernen in Zusammenhang bringen.

Auch wenn Packard und Knowlton (2002) oder White und McDonald (2002) explizit eine Interferenz zwischen Striatum und Hippocampus postulieren, kann aufgrund unserer Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, dass der Hippocampus nicht auch mit anderen Strukturen, die beim sequentiellen oder allgemeiner prozeduralem Lernen relevant sind, interferiert (z.B. kortikalen Arealen oder Cerebellum).

²² Als drittes parallel arbeitendes Gedächtnissystem beschreiben White & McDonald die Amygdala.

7.4.3. INTERFERENZEFFEKTE IM HUMANBEREICH

Interferenzeffekte nach hippocampalen Läsionen ließen sich sowohl bei Nagern (Lee et al. 2008, Wirth et al. 1998, Bussey et al. 1998, Moss & Zoah 1973), als auch bei nichtmenschlichen Primaten (Kwok & Buckley 2009) nachweisen.

In einer fMRI Studie zum Klassifikationslernen von Foerde et al. (2006) zeigte sich eine Korrelation zwischen hippocampaler Aktivität und explizitem Lernen (probabilistische Klassifikationsaufgabe ohne Distraktoraufgabe) sowie zwischen striataler Aktivierung und implizitem Lernen (probabilistische Klassifikation mit Distraktoraufgabe). Allerdings zeigte sich auch während des expliziten Lernens eine striatale Aktivierung, die die AutorInnen dahingehend erklären, dass separate Gedächtnissysteme parallel zum Teil redundante Informationen erfassen, was bei der Verhaltensausführung [response level] zu einer Konkurrenz zwischen den Systemen führen kann: Das implizite/striatale Gedächtnissystem ist in der expliziten Aufgabe zwar aktiv, hat aber keinen Einfluss auf das Verhalten, sobald robuste deklarative Repräsentationen aufgebaut sind.

Weitere Hinweise auf eine Interferenz zwischen implizitem und explizitem Lernen beim Menschen finden sich bei Howard & Howard (2001, siehe 3.5.), wobei in dieser Studie im Gegensatz zu den zitierten Tierstudien nicht einfaches S-R-Lernen, sondern explizit sequentielles Lernen untersucht wurde.

Studien, die eine Leistungssteigerung im impliziten oder spezifischer im sequentiellen Lernen nach hippocampalen Schädigungen im Humanbereich nachweisen konnten, existieren nach Kenntnisstand des Autors jedoch nicht. Anbieten würden sich hier SRTT-Studien mit Anoxie-PatientInnen (Schädigung des Hippocampus durch Sauerstoffunterversorgung) oder Ischämiesyndrom (Schädigung des Hippocampus durch reduzierten Blutfluss), da bei diesen PatientInnen der Hippocampus bilateral beschädigt ist und zudem andere Regionen nicht oder nur wenig betroffen sind (Stark 2007).

7.5. ZUSAMMENFASSENDE BEWERTUNG DES RATTEN-SRTT

Über die der Arbeit zugrunde liegenden Studien (Eckart et al. 2010a/b, in Vorbereitung), sowie die vorhergehenden Studien mit dem Ratten SRTT (Domenger & Schwarting 2005, 2006, 2007, 2008) hinweg, hat sich der Test als ein geeignetes Mittel zur Untersuchung sequentiellen Lernens im Nagernmodell bewährt. Anhand des S-R-S-R-Tests lassen sich Interferenzen zwischen sequentieller und zufälliger Reizdarbietung untersuchen, wobei die Genauigkeit anscheinend im Vergleich zu den Reaktionszeiten das sensitivere Maß darstellt (siehe Eckart et al. 2010b, in Vorbereitung). Zur Messung der Automatisierung sequentiellen Verhaltens hat sich der „Sequence Violation Test“ wiederholt bewährt. Zudem konnte die Sensitivität des SRTT gegenüber pharmakologischen und neurotoxischen Manipulationen in den oben genannten Experimenten mehrfach demonstriert werden.

Nachteilig ist anzuführen, dass bei dem Ratten-SRTT intensives Shaping und Training nötig ist, bevor die Tiere getestet werden können. Im Humanbereich müssen hingegen den Versuchspersonen nur kurze Instruktionen gegeben werden. Darüber hinaus müssen die Tiere während des Shapings, Trainings und der Testung verstärkt werden. Auch wenn Sequenz und Verstärkung dissoziiert sind (siehe Abschnitt 3) entstehen hierdurch kurze Unterbrechungen, die bei der Humanversion nicht auftreten.

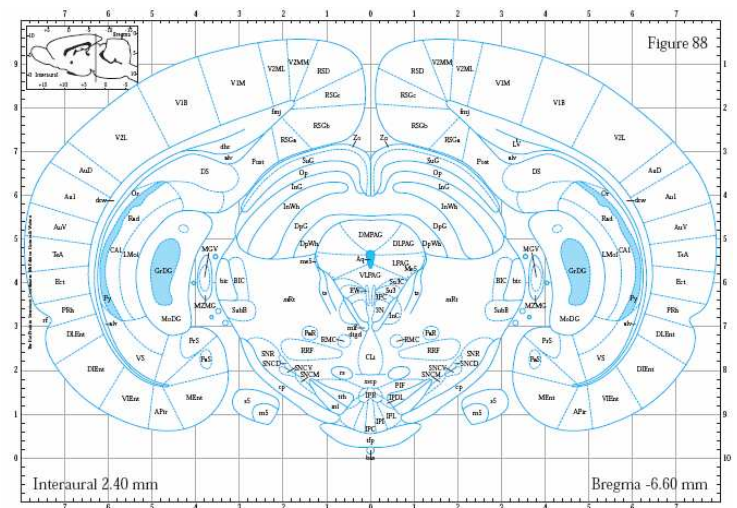
7.6. OFFENE FRAGEN UND WEITERE SRTT-EXPERIMENTE

Wie bei fast jeder wissenschaftlichen Arbeit hat man auch in der vorliegenden am Ende mehr zusätzliche offene Fragen als man Antworten erhalten hat. Abschließend werden daher im Folgenden Vorschläge für weitere Experimente präsentiert, die konkret dazu dienen könnten, die gefundene Interferenz in STUDIE III weiter zu untersuchen. Zudem werden weitere nahe liegende Anwendungsgebiete für den Ratten-SRTT aufgezählt.

1. Welche Rolle spielen der präfrontale Kortex bzw. frontostriatale Schaltkreise? Bisher existieren nur wenige Studien, die die Rolle des präfrontalen Kortex im sequentiellen Lernen untersuchen (Beiser & Houk 1998, Saint-Cry 2003, Bailey & Mair 2007; alle drei Publikationen sprechen für eine Rolle des präfrontalen Kortex im sequentiellen Lernen). Aufgrund des zuvor vorgestellten Modells müssten sich bei präfrontalen Läsionen sowohl im räumlichen, als auch im sequentiellen Lernen Defizite zeigen. Zudem sollte untersucht werden, ob der präfrontale Kortex beim sequentiellen Lernen allgemein eine Rolle spielt (hierfür müssten Läsionen vor der Trainingsphase gesetzt werden), oder ob er auch eine Rolle beim Abruf zuvor gelernter Sequenzen spielt (hierfür müssten Läsionen zwischen Trainings- und Testungsphase gesetzt werden).
2. Sollte die aufgestellte Hypothese stimmen, dass die Interferenz zwischen Hippocampus und Striatum auf gleichzeitige Projektionen beider Strukturen in den frontalen Kortex zurückzuführen ist, müssten sich bei Ratten nach dem Durchtrennen der Faserverbindungen zwischen Hippocampus und frontalem Kortex (sonst aber intaktem Hippocampus) ebenfalls erhöhte Leistungen im SRTT zeigen.
3. Zur Überprüfung der Hypothese, dass die Interferenzen nur bei minimalen räumlichen Anforderungen auftreten, könnten diese in dem Ratten-SRTT erhöht werden – z.B. indem die Abstände zwischen den Nose Poke Holes vergrößert werden. Nach dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Modell sollten dann keine Leistungsvorteile bei hippocampalen Läsionen entstehen, da die räumlichen Informationen an Relevanz gewinnen würden.

Weitere mögliche Anwendungsgebiete des Ratten-SRTT, die sich direkt an Humanstudien anschließen würden, wären die Frage nach der Rolle von Cerebellum oder motorischen kortikalen Arealen im sequentiellen Lernen, wobei hier auch wieder getrennt untersucht werden müsste, welche Rolle diese Areale beim sequentiellen Lernen und der sequentiellen Performanz spielen.

DISKUSSION



8. LITERATURVERZEICHNIS

LITERATURVERZEICHNIS

A:

- Adams, F. S., Schwarting, R. K., & Huston, J. P. (1994). Behavioral and neurochemical asymmetries following unilateral trephination of the rat skull: is this control operation always appropriate? *Physiol Behav*, 55(5), 947-952.
- Albouy, G., Sterpenich, V., Baiteau, E., Vandewalle, G., Desseilles, M., Dang-Vu, T., et al. (2008). Both the hippocampus and striatum are involved in consolidation of motor sequence memory. *Neuron*, 58(2), 261-272.
- Alcaro, A., Huber, R., & Panksepp, J. (2007). Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: an affective neuroethological perspective. *Brain Res Rev*, 56(2), 283-321.
- Ashby, F. G., Ennis, J. M., & Spiering, B. J. (2007). A neurobiological theory of automaticity in perceptual categorization. *Psychol Rev*, 114(3), 632-656.
- Ashby, F. G., Turner, B. O., & Horvitz, J. C. (2010). Cortical and basal ganglia contributions to habit learning and automaticity. *Trends Cogn Sci*, 14(5), 208-215.
- Averbeck, B. B., & Lee, D. (2007). Prefrontal neural correlates of memory for sequences. *J Neurosci*, 27(9), 2204-2211.

B:

- Badgaiyan, R. D., Fischman, A. J., & Alpert, N. M. (2007). Striatal dopamine release in sequential learning. *Neuroimage*, 38(3), 549-556.
- Bailey, K. R., & Mair, R. G. (2006). The role of striatum in initiation and execution of learned action sequences in rats. *J Neurosci*, 26(3), 1016-1025.
- Bailey, K. R., & Mair, R. G. (2007). Effects of frontal cortex lesions on action sequence learning in the rat. *Eur J Neurosci*, 25(9), 2905-2915.
- Barbelivien, A., Ruotsalainen, S., & Sirvio, J. (2001). Metabolic alterations in the prefrontal and cingulate cortices are related to behavioral deficits in a rodent model of attention-deficit hyperactivity disorder. *Cereb Cortex*, 11(11), 1056-1063.
- Bast, T. (2007). Toward an integrative perspective on hippocampal function: from the rapid encoding of experience to adaptive behavior. *Rev Neurosci*, 18(3-4), 253-281.
- Bast, T., Wilson, I. A., Witter, M. P., & Morris, R. G. (2009). From rapid place learning to behavioral performance: a key role for the intermediate hippocampus. *PLoS Biol*, 7(4), e1000089.
- Bast, T., Zhang, W. N., & Feldon, J. (2003). Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. *Hippocampus*, 13(6), 657-675.
- Beiser, D. G., & Houk, J. C. (1998). Model of cortical-basal ganglionic processing: encoding the serial order of sensory events. *J Neurophysiol*, 79(6), 3168-3188.
- Berger, K., Przedborski, S., & Cadet, J. L. (1991). Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats. *Brain Res Bull*, 26(2), 301-307.
- Berns, G. S., & Sejnowski, T. J. (1998). A computational model of how the basal ganglia produce sequences. *J Cogn Neurosci*, 10(1), 108-121.
- Bevins, R. A., & Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc*, 1(3), 1306-1311.
- Blandini, F., Levandis, G., Bazzini, E., Nappi, G., & Armentero, M. T. (2007). Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations

- following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur J Neurosci*, 25(2), 397-405.
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rub, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*, 318(1), 121-134.
- Braak, H., Rub, U., & Del Tredici, K. (2006). Cognitive decline correlates with neuropathological stage in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 248(1-2), 255-258.
- Branchi, I., D'Andrea, I., Armida, M., Cassano, T., Pezzola, A., Potenza, R. L., et al. (2008). Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: Investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. *J Neurosci Res*, 86(9), 2050-2061.
- Brody, B. A., & Pribram, K. H. (1978). The role of frontal and parietal cortex in cognitive processing: tests of spatial and sequence functions. *Brain*, 101(4), 607-633.
- Bussey, T. J., Clea Warburton, E., Aggleton, J. P., & Muir, J. L. (1998). Fornix lesions can facilitate acquisition of the transverse patterning task: a challenge for "configural" theories of hippocampal function. *J Neurosci*, 18(4), 1622-1631.

C:

- Camicioli, R. M., Wieler, M., de Frias, C. M., & Martin, W. R. (2008). Early, untreated Parkinson's disease patients show reaction time variability. *Neurosci Lett*, 441(1), 77-80.
- Cho, Y. H., & Jeantet, Y. (2010). Differential involvement of prefrontal cortex, striatum, and hippocampus in DRL performance in mice. *Neurobiol Learn Mem*, 93(1), 85-91.
- Christie, M. A., & Dalrymple-Alford, J. C. (2004). A new rat model of the human serial reaction time task: contrasting effects of caudate and hippocampal lesions. *J Neurosci*, 24(5), 1034-1039.
- Cohen, A., Ivry, R. I., Keele, S. W. (1990). Attention and Structure in Sequence Learning. *Journal of Experimental Psychology*, 16(1), 17-30.
- Cole, B. J., & Robbins, T. W. (1989). Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens septi on performance of a 5-choice serial reaction time task in rats: implications for theories of selective attention and arousal. *Behav Brain Res*, 33(2), 165-179.
- Compton, D. M. (2001). Are memories for stimulus-stimulus associations or stimulus-response associations responsible for serial-pattern learning in rats? *Physiol Behav*, 72(5), 643-652.
- Conway, C. M., & Christiansen, M. H. (2001). Sequential learning in non-human primates. *Trends Cogn Sci*, 5(12), 539-546.
- Curran, T. (1995). On the Neural Mechanisms of Sequence Learning. *Psyche*, 2(12).

D:

- Da Cunha, C., Gevaerd, M. S., Vital, M. A., Miyoshi, E., Andreatini, R., Silveira, R., et al. (2001). Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res*, 124(1), 9-18.
- Da Cunha, C., Wietzikoski, E. C., Dombrowski, P., Bortolanza, M., Santos, L. M., Boschen, S. L., et al. (2009). Learning processing in the basal ganglia: a mosaic of broken mirrors. *Behav Brain Res*, 199(1), 157-170.
- Da Cunha, C., Wietzikoski, S., Wietzikoski, E. C., Miyoshi, E., Ferro, M. M., Anselmo-Franci, J. A., et al. (2003). Evidence for the substantia nigra pars compacta as an es-

- sential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. *Neurobiol Learn Mem*, 79(3), 236-242.
- Davidson, T. L., Kanoski, S. E., Chan, K., Clegg, D. J., Benoit, S. C., & Jarrard, L. E. (2010). Hippocampal lesions impair retention of discriminative responding based on energy state cues. *Behav Neurosci*, 124(1), 97-105.
- de Hoz, L., Knox, J., & Morris, R. G. (2003). Longitudinal axis of the hippocampus: both septal and temporal poles of the hippocampus support water maze spatial learning depending on the training protocol. *Hippocampus*, 13(5), 587-603.
- de Hoz, L., Martin, S. J., & Morris, R. G. (2004). Forgetting, reminding, and remembering: the retrieval of lost spatial memory. *PLoS Biol*, 2(8), E225.
- DeCoteau, W. E., & Kesner, R. P. (2000). A double dissociation between the rat hippocampus and medial caudoputamen in processing two forms of knowledge. *Behav Neurosci*, 114(6), 1096-1108.
- Del Tredici, K., Rub, U., De Vos, R. A., Bohl, J. R., & Braak, H. (2002). Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(5), 413-426.
- Dere, E., Kart-Teke, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2006). The case for episodic memory in animals. *Neurosci Biobehav Rev*, 30(8), 1206-1224.
- Deroost, N., Kerckhofs, E., Coene, M., Wijnants, G., & Soetens, E. (2006). Learning sequence movements in a homogenous sample of patients with Parkinson's disease. *Neuropsychologia*, 44(10), 1653-1662.
- Dickinson, A. (1985). Actions and Habits: the Development of Behavioural Autonomy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond*, 308, 67-78.
- Dirnberger, G., Novak, J., Nasel, C., & Zehnter, M. (in press). Separating coordinative and executive dysfunction in cerebellar patients during motor skill acquisition. *Neuropsychologia*, 48(5), 1200-1208.
- Domenger, D., & Schwarting, R. K. (2005). Sequential behavior in the rat: a new model using food-reinforced instrumental behavior. *Behav Brain Res*, 160(2), 197-207.
- Domenger, D., & Schwarting, R. K. (2006). The serial reaction time task in the rat: effects of D1 and D2 dopamine-receptor antagonists. *Behav Brain Res*, 175(2), 212-222.
- Domenger, D., & Schwarting, R. K. (2007). Sequential behavior in the rat: role of skill and attention. *Exp Brain Res*, 182(2), 223-231.
- Domenger, D., & Schwarting, R. K. (2008). Effects of neostriatal 6-OHDA lesion on performance in a rat sequential reaction time task. *Neurosci Lett*, 444(3), 212-216.
- Dominey, P. F., & Georgieff, N. (1997). Schizophrenics learn surface but not abstract structure in a serial reaction time task. *Neuroreport*, 8(13), 2877-2882.
- Dominey, P. F., & Jeannerod, M. (1997). Contribution of frontostriatal function to sequence learning in Parkinson's disease: evidence for dissociable systems. *Neuroreport*, 8(5), iii-ix.
- Dominey, P. F., Ventre-Dominey, J., Broussolle, E., & Jeannerod, M. (1997). Analogical transfer is effective in a serial reaction time task in Parkinson's disease: evidence for a dissociable form of sequence learning. *Neuropsychologia*, 35(1), 1-9.
- Doyon, J., Owen, A. M., Petrides, M., Sziklas, V., & Evans, A. C. (1996). Functional anatomy of visuomotor skill learning in human subjects examined with positron emission tomography. *Eur J Neurosci*, 8(4), 637-648.
- Doyon, J., Penhune, V., & Ungerleider, L. G. (2003). Distinct contribution of the corticostriatal and cortico-cerebellar systems to motor skill learning. *Neuropsychologia*, 41(3), 252-262.
- Doyon, J., Song, A. W., Karni, A., Lalonde, F., Adams, M. M., & Ungerleider, L. G. (2002). Experience-dependent changes in cerebellar contributions to motor sequence learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(2), 1017-1022.

Doyon, J., Ungerleider, L. G. (2002). Functional Anatomy of Motor Skill Learning. In L. R. Squire, Schachter, D.L. (Ed.), *Neuropsychology of Memory* (pp. 225-238). New York: Guilford.

E:

- Eckart, M. T., Huelse-Matia, M. C., McDonald, R. S., & Schwarting, R. K. (2010a). 6-hydroxydopamine lesions in the rat neostriatum impair sequential learning in a serial reaction time task. *Neurotox Res*, 17(3), 287-298.
- Eckart, M. T., Huelse-Matia, M. C., Loer, D., & Schwarting, R. K. (2010b). Acquisition and performance in a rat sequential reaction time task is not affected by subtotal ventral striatal 6-OHDA lesions. *Neurosci Lett*, 476(1), 27-31.
- Eckart, M. T., Huelse-Matia, M.C., Loer, D., Schwarting, R.K.W. (in Vorbereitung). Dorsal hippocampal lesions boost performance in the rat sequential reaction time task.
- Exner, C., Boucsein, K., Degner, D., & Irle, E. (2006a). State-dependent implicit learning deficit in schizophrenia: evidence from 20-month follow-up. *Psychiatry Res*, 142(1), 39-52.
- Exner, C., Weniger, G., Schmidt-Samoa, C., & Irle, E. (2006b). Reduced size of the pre-supplementary motor cortex and impaired motor sequence learning in first-episode schizophrenia. *Schizophr Res*, 84(2-3), 386-396.

F:

- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1), 7-19.
- Ferraro, F. R., Balota, D. A., & Connor, L. T. (1993). Implicit memory and the formation of new associations in nondemented Parkinson's disease individuals and individuals with senile dementia of the Alzheimer type: a serial reaction time (SRT) investigation. *Brain Cogn*, 21(2), 163-180.
- Foerde, K., Knowlton, B. J., & Poldrack, R. A. (2006). Modulation of competing memory systems by distraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(31), 11778-11783.
- Fornaguera, J., Carey, R. J., Dai, H., Huston, J. P., & Schwarting, R. K. (1994a). Differentiation of motor inactivation from movement asymmetry effects in an animal model of hemi-parkinsonism. *Neuroreport*, 6(1), 173-176.
- Fornaguera, J., Carey, R. J., Huston, J. P., & Schwarting, R. K. (1994b). Behavioral asymmetries and recovery in rats with different degrees of unilateral striatal dopamine depletion. *Brain Res*, 664(1-2), 178-188.
- Fornaguera, J., & Schwarting, R. K. (1999). Early behavioral changes after nigro-striatal system damage can serve as predictors of striatal dopamine depletion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 23(8), 1353-1368.
- Fornaguera, J., & Schwarting, R. K. (2002). Time course of deficits in open field behavior after unilateral neostriatal 6-hydroxydopamine lesions. *Neurotox Res*, 4(1), 41-49.
- Fujii, N., & Graybiel, A. M. (2005). Time-varying covariance of neural activities recorded in striatum and frontal cortex as monkeys perform sequential-saccade tasks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(25), 9032-9037.

G:

- Gallagher, M., & Holland, P. C. (1992). Preserved configural learning and spatial learning impairment in rats with hippocampal damage. *Hippocampus*, 2(1), 81-88.
- Gawrys, L., Szatkowska, I., Jamrozik, Z., Janik, P., Friedman, A., & Kaczmarek, L. (2008). Nonverbal deficits in explicit and implicit memory of Parkinson's disease patients. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 68(1), 58-72.
- Gerfen, C. R. (2004). Basal Ganglia. In G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System*. London, San Diego: Elsevier.
- Gheysen, F., Van Opstal, F., Roggeman, C., Van Waelvelde, H., & Fias, W. (2010). Hippocampal contribution to early and later stages of implicit motor sequence learning. *Exp Brain Res*, 202(4), 795-807.
- Gill, K. M., Bernstein, I. L., & Mizumori, S. J. (2007). Immediate early gene activation in hippocampus and dorsal striatum: effects of explicit place and response training. *Neurobiol Learn Mem*, 87(4), 583-596.
- Godsil, B. P., Stefanacci, L., & Fanselow, M. S. (2005). Bright light suppresses hyperactivity induced by excitotoxic dorsal hippocampus lesions in the rat. *Behav Neurosci*, 119(5), 1339-1352.
- Goldman, B. L., Martin, E. D., Calamari, J. E., Woodard, J. L., Chik, H. M., Messina, M. G., et al. (2008). Implicit learning, thought-focused attention and obsessive-compulsive disorder: a replication and extension. *Behav Res Ther*, 46(1), 48-61.
- Gomez-Beldarrain, M., Garcia-Monco, J. C., Rubio, B., & Pascual-Leone, A. (1998). Effect of focal cerebellar lesions on procedural learning in the serial reaction time task. *Exp Brain Res*, 120(1), 25-30.
- Good, M. A., & Hale, G. (2007). The "Swedish" mutation of the amyloid precursor protein (APP^{swe}) dissociates components of object-location memory in aged Tg2576 mice. *Behav Neurosci*, 121(6), 1180-1191.
- Graybiel, A. M. (1991). Basal ganglia--input, neural activity, and relation to the cortex. *Curr Opin Neurobiol*, 1(4), 644-651.
- Graybiel, A. M. (1998). The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiol Learn Mem*, 70(1-2), 119-136.
- Graybiel, A. M. (2005). The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Curr Opin Neurobiol*, 15(6), 638-644.
- Grossman, R., Shohami, E., Alexandrovich, A., Yatsiv, I., Kloog, Y., & Biegon, A. (2003). Increase in peripheral benzodiazepine receptors and loss of glutamate NMDA receptors in a mouse model of closed head injury: a quantitative autoradiographic study. *Neuroimage*, 20(4), 1971-1981.

H:

- Helmuth, L. L., Mayr, U., & Daum, I. (2000). Sequence learning in Parkinson's disease: a comparison of spatial-attention and number-response sequences. *Neuropsychologia*, 38(11), 1443-1451.
- Hirshler, Y. K., Polat, U., & Biegon, A. (2010). Intracranial electrode implantation produces regional neuroinflammation and memory deficits in rats. *Exp Neurol*, 222(1), 42-50.
- Holzkamp, K. (1985). *Grundlegung der Psychologie*. Frankfurt/Main; New York: Campus Verlag.
- Hopkins, R. O., Waldram, K., & Kesner, R. P. (2004). Sequences assessed by declarative and procedural tests of memory in amnesic patients with hippocampal damage. *Neuropsychologia*, 42(14), 1877-1886.

- Hornykiewicz, O. (2008). Basic research on dopamine in Parkinson's disease and the discovery of the nigrostriatal dopamine pathway: the view of an eyewitness. *Neurodegener Dis*, 5(3-4), 114-117.
- Howard, D. V., & Howard, J. H., Jr. (2001). When it does hurt to try: adult age differences in the effects of instructions on implicit pattern learning. *Psychon Bull Rev*, 8(4), 798-805.

J:

- Jackson, G. M., Jackson, S. R., Harrison, J., Henderson, L., & Kennard, C. (1995). Serial reaction time learning and Parkinson's disease: evidence for a procedural learning deficit. *Neuropsychologia*, 33(5), 577-593.
- Jarrard, L. E. (2002). Use of excitotoxins to lesion the hippocampus: update. *Hippocampus*, 12(3), 405-414.

K:

- Kandel, E. R. (2008). *Psychiatrie, Psychoanalyse und die neue Biologie des Geistes*. Frankfurt am Main: Suhrkamp.
- Kandel, E. R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (2000). The Basal Ganglia. In *Principles of Neural Science* (4. ed.).
- Kart-Teke, E., De Souza Silva, M. A., Huston, J. P., & Dere, E. (2006). Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiol Learn Mem*, 85(2), 173-182.
- Kelly, S. W., Jahanshahi, M., & Dirnberger, G. (2004). Learning of ambiguous versus hybrid sequences by patients with Parkinson's disease. *Neuropsychologia*, 42(10), 1350-1357.
- Kennerley, S. W., Sakai, K., & Rushworth, M. F. (2004). Organization of action sequences and the role of the pre-SMA. *J Neurophysiol*, 91(2), 978-993.
- Knopman, D., & Nissen, M. J. (1991). Procedural learning is impaired in Huntington's disease: evidence from the serial reaction time task. *Neuropsychologia*, 29(3), 245-254.
- Kwok, S. C., & Buckley, M. J. (2009). Fornix transected macaques make fewer perseverative errors than controls during the early stages of learning conditional visuospatial discriminations. *Behav Brain Res*, 205(1), 207-213.

L:

- Lang, A. E., & Lozano, A. M. (1998a). Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*, 339(15), 1044-1053.
- Lang, A. E., & Lozano, A. M. (1998b). Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*, 339(16), 1130-1143.
- Leh, S. E., Petrides, M., & Strafella, A. P. The neural circuitry of executive functions in healthy subjects and Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 70-85.
- Lee, A. S., Duman, R. S., & Pittenger, C. (2008). A double dissociation revealing bidirectional competition between striatum and hippocampus during learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(44), 17163-17168.
- Lee, T., Jarome, T., Li, S. J., Kim, J. J., & Helmstetter, F. J. (2009). Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal magnetic resonance imaging study. *Neuroreport*, 20(17), 1554-1558.

Leh, S. E., Petrides, M., & Strafella, A. P. The neural circuitry of executive functions in healthy subjects and Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 70-85.

M:

Marvel, C. L., Turner, B. M., O'Leary, D. S., Johnson, H. J., Pierson, R. K., Ponto, L. L., et al. (2007). The neural correlates of implicit sequence learning in schizophrenia. *Neuropsychology*, 21(6), 761-777.

McDonald, A. J. (1991). Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience*, 44(1), 1-14.

McDonald, R. J., & White, N. M. (1994). Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behav Neural Biol*, 61(3), 260-270.

Mink, J. W. (1999). Basal Ganglia. In M. J. Zigmond, Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L., Squire, L.R. (Ed.), *Fundamental Neuroscience*: Academic Press.

Morris, R. G. (2007). Theories on Hippocampal Function. In M. Anderson, Amaral, Bliss & O'Keefe (Ed.), *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press.

Moss, M., Mahut, H., & Zola-Morgan, S. (1981). Concurrent discrimination learning of monkeys after hippocampal, entorhinal, or fornix lesions. *J Neurosci*, 1(3), 227-240.

N:

Nagy, H., Keri, S., Myers, C. E., Benedek, G., Shohamy, D., & Gluck, M. A. (2007). Cognitive sequence learning in Parkinson's disease and amnesic mild cognitive impairment: Dissociation between sequential and non-sequential learning of associations. *Neuropsychologia*, 45(7), 1386-1392.

Nissen, M. J., Bullemer, P. (1987). Attentional Requirements of Learning: Evidence from Performance Measures. *Cognitive Psychology*, 19, 1-32.

O:

Ogura, T., Ogata, M., Akita, H., Jitsuki, S., Akiba, L., Noda, K., et al. (2005). Impaired acquisition of skilled behavior in rotarod task by moderate depletion of striatal dopamine in a pre-symptomatic stage model of Parkinson's disease. *Neurosci Res*, 51(3), 299-308.

Owen, A. M. (2004). Cognitive dysfunction in Parkinson's disease: the role of frontostriatal circuitry. *Neuroscientist*, 10(6), 525-537.

P:

Packard, M. G. (1999). Glutamate infused posttraining into the hippocampus or caudate-putamen differentially strengthens place and response learning. *PNAS*, 96(22), 12881-12886.

Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci*, 25, 563-593.

Packard, M. G., & McGaugh, J. L. (1996). Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem*, 65(1), 65-72.

- Paxinos, G. (2004). *The Rat Nervous System* (Vol. 3). San Diego: Elsevier.
- Paxinos, G., Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Vol. 6): Elsevier.
- Peleg-Raibstein, D., Yee, B. K., Feldon, J., & Hauser, J. (2009). The amphetamine sensitization model of schizophrenia: relevance beyond psychotic symptoms? *Psychopharmacology (Berl)*, 206(4), 603-621.
- Perez-Costas, E., Melendez-Ferro, M., & Roberts, R. C. (2010). Basal ganglia pathology in schizophrenia: dopamine connections and anomalies. *J Neurochem*, 113(2), 287-302.
- Postuma, R. B., & Dagher, A. (2006). Basal ganglia functional connectivity based on a meta-analysis of 126 positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging publications. *Cereb Cortex*, 16(10), 1508-1521.
- Procyk, E., Ford Dominey, P., Amiez, C., & Joseph, J. P. (2000a). The effects of sequence structure and reward schedule on serial reaction time learning in the monkey. *Brain Res Cogn Brain Res*, 9(3), 239-248.
- Procyk, E., Tanaka, Y. L., & Joseph, J. P. (2000b). Anterior cingulate activity during routine and non-routine sequential behaviors in macaques. *Nat Neurosci*, 3(5), 502-508.

R:

- Rao V.L., D. A., Bowen K.K., Dempsey R.J. (2000). Traumatic brain injury leads to increased expression of peripheral-type benzodiazepine receptors, neuronal death, and activation of astrocytes and microglia in rat thalamus. *Experimental Neurology*, 161, 102-114.
- Rauch, S. L., Wedig, M. M., Wright, C. I., Martis, B., McMullin, K. G., Shin, L. M., et al. (2007a). Functional magnetic resonance imaging study of regional brain activation during implicit sequence learning in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry*, 61(3), 330-336.
- Rauch, S. L., Wright, C. I., Savage, C. R., Martis, B., McMullin, K. G., Wedig, M. M., et al. (2007b). Brain activation during implicit sequence learning in individuals with trichotillomania. *Psychiatry Res*, 154(3), 233-240.
- Reed, J., Johnson, P. (1994). Assessing Implicit Learning With Indirect Tests: Determinating What Is Learned About Sequence Structure. *J Exp Psych: Learning Memory Cogn*, 20(3), 585-594.
- Robbins, T. W. (2002). The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology (Berl)*, 163(3-4), 362-380.
- Robertson, E. M. (2007). The serial reaction time task: implicit motor skill learning? *J Neurosci*, 27(38), 10073-10075.
- Ross, R. S., Brown, T. I., & Stern, C. E. (2009). The retrieval of learned sequences engages the hippocampus: Evidence from fMRI. *Hippocampus*, 19(9), 790-799.
- Rossato, J. I., Zinn, C. G., Furini, C., Bevilacqua, L. R., Medina, J. H., Cammarota, M., et al. (2006). A link between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain. *An Acad Bras Cienc*, 78(3), 515-523.

S:

- Saint-Cyr, J. A. (2003). Frontal-striatal circuit functions: context, sequence, and consequence. *J Int Neuropsychol Soc*, 9(1), 103-127.
- Schendan, H. E., Searl, M. M., Melrose, R. J., & Stern, C. E. (2003). An fMRI study of the role of the medial temporal lobe in implicit and explicit sequence learning. *Neuron*, 37(6), 1013-1025.

- Schulz, J. B. (2007). Parkinson heißt mehr als motorische Defizite. *der Neurologe & Psychiater*, 12/07, 43-45.
- Schwabe, K., Klein, S., & Koch, M. (2006). Behavioural effects of neonatal lesions of the medial prefrontal cortex and subchronic pubertal treatment with phencyclidine of adult rats. *Behav Brain Res*, 168(1), 150-160.
- Schwartz, R. K. (2008). Rodent models of serial reaction time tasks and their implementation in neurobiological research. *Behav Brain Res*, 199(1), 76-88.
- Schwartz, R. K., & Huston, J. P. (1996a). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol*, 50(2-3), 275-331.
- Schwartz, R. K., & Huston, J. P. (1996b). Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of mesostriatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog Neurobiol*, 49(3), 215-266.
- Shohamy, D., Myers, C. E., Grossman, S., Sage, J., & Gluck, M. A. (2005). The role of dopamine in cognitive sequence learning: evidence from Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, 156(2), 191-199.
- Siebert, R. J., Taylor, K. D., Weatherall, M., & Abernethy, D. A. (2006). Is implicit sequence learning impaired in Parkinson's disease? A meta-analysis. *Neuropsychology*, 20(4), 490-495.
- Siebert, R. J., Weatherall, M., & Bell, E. M. (2008). Is implicit sequence learning impaired in schizophrenia? A meta-analysis. *Brain Cogn*, 67(3), 351-359.
- Smith, J., Siebert, R. J., McDowall, J., & Abernethy, D. (2001). Preserved implicit learning on both the serial reaction time task and artificial grammar in patients with Parkinson's disease. *Brain Cogn*, 45(3), 378-391.
- Smith, J. G., & McDowall, J. (2004). Impaired higher order implicit sequence learning on the verbal version of the serial reaction time task in patients with Parkinson's disease. *Neuropsychology*, 18(4), 679-691.
- Smith, J. G., & McDowall, J. (2006). The implicit sequence learning deficit in patients with Parkinson's disease: a matter of impaired sequence integration? *Neuropsychologia*, 44(2), 275-288.
- Sommer, M., Grafman, J., Clark, K., & Hallett, M. (1999). Learning in Parkinson's disease: eyeblink conditioning, declarative learning, and procedural learning. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 67(1), 27-34.
- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev*, 99(2), 195-231.
- Stark, C. (2007). Functional Role of the Hippocampus. In M. Anderson, Amaral, Bliss & O'Keefe (Ed.), *The Hippocampus Book*. New York: Oxford.
- Stocco, A., Lebiere, C., & Anderson, J. R. Conditional routing of information to the cortex: a model of the basal ganglia's role in cognitive coordination. *Psychol Rev*, 117(2), 541-574.

T:

- Teather, L. A., Packard, M. G., Smith, D. E., Ellis-Behnke, R. G., & Bazan, N. G. (2005). Differential induction of c-Jun and Fos-like proteins in rat hippocampus and dorsal striatum after training in two water maze tasks. *Neurobiol Learn Mem*, 84(2), 75-84.
- Teng, E., & Squire, L. R. (1999). Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature*, 400(6745), 675-677.
- Trepel, M. (2004). *Neuroanatomie*. München: Urban & Fischer.

V:

- Vandenbossche, J., Deroost, N., Soetens, E., & Kerckhofs, E. (2009). Does implicit learning in non-demented Parkinson's disease depend on the level of cognitive functioning? *Brain Cogn*, 69(1), 194-199.

W:

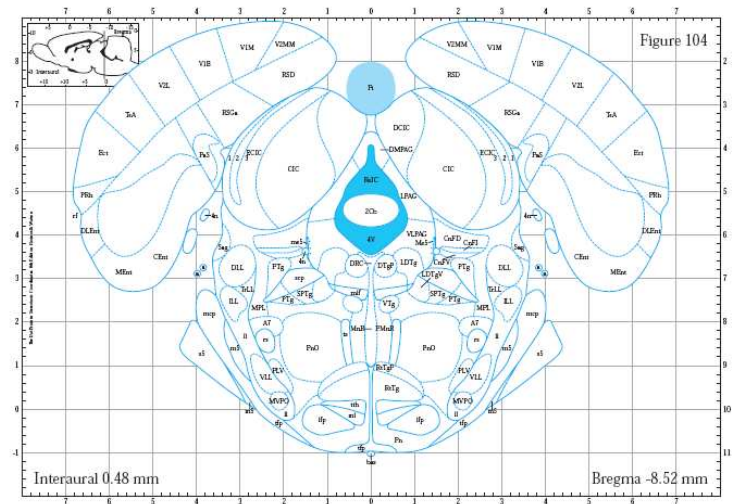
- Werheid, K., Ziessler, M., Nattkemper, D., & Yves von Cramon, D. (2003a). Sequence learning in Parkinson's disease: the effect of spatial stimulus-response compatibility. *Brain Cogn*, 52(2), 239-249.
- Werheid, K., Zysset, S., Muller, A., Reuter, M., & von Cramon, D. Y. (2003b). Rule learning in a serial reaction time task: an fMRI study on patients with early Parkinson's disease. *Brain Res Cogn Brain Res*, 16(2), 273-284.
- Westwater, H., McDowall, J., Siegert, R., Mossman, S., & Abernethy, D. (1998). Implicit learning in Parkinson's disease: evidence from a verbal version of the serial reaction time task. *J Clin Exp Neuropsychol*, 20(3), 413-418.
- White, N. M., & McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem*, 77(2), 125-184.
- Wilkinson, L., Khan, Z., & Jahanshahi, M. (2009). The role of the basal ganglia and its cortical connections in sequence learning: Evidence from implicit and explicit sequence learning in Parkinson's disease. *Neuropsychologia*.
- Wirth, S., Ferry, B., & Di Scala, G. (1998). Facilitation of olfactory recognition by lateral entorhinal cortex lesion in rats. *Behav Brain Res*, 91(1-2), 49-59.
- Witter, M. P., Amaral, D.G. (2004). Hippocampal Formation. In G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System*. London, San Diego: Elsevier.

Y:

- Yin, H. H., & Knowlton, B. J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci*, 7(6), 464-476.

Z:

- Zola, S. M., & Mahut, H. (1973). Paradoxical facilitation of object reversal learning after transection of the fornix in monkeys. *Neuropsychologia*, 11(3), 271-284.



9. ANHANG

9.1. ABLAUF DER SHAPINGPHASE

In der Shapingphase des SRTT werden die Tiere 20 min pro Tag trainiert. Wie viele Shapingtage nötig sind, hängt von der individuellen Lerngeschwindigkeit ab und kann von Tier zu Tier unterschiedlich sein.

Phase I:

Vor Beginn der Phase werden drei Futterpillen in den Futterspender gelegt, damit die Tiere diesen mit der Nahrung assoziieren. Zudem ist Loch drei aktiviert (das Loch ist beleuchtet, jeder Poke in das Loch wird mit einer Futterpille verstärkt). Zusätzlich kann der Futterspender manuell durch den Versuchsleiter/die Versuchsleiterin ausgelöst werden.

Anfangs werden die Tiere manuell verstärkt, sobald sie Explorationsverhalten in der Nähe des Futterspenders und der Nose Poke Holes zeigen. Durch das Explorationsverhalten lernen die Tiere in der Regel, dass Nose Pokes in das beleuchtete Loch verstärkt werden.

Bei Pokes in eines der nicht-aktiven Nose Poke Holes werden ein leicht aversiver Lichtreiz und Ton appliziert (dies gilt auch für die weiteren Trainingsphasen).

Sobald die Assoziation „Poke in Loch drei – Verstärkung“ gelernt wurde, wird Loch vier aktiviert (Relevant ist hier weniger die Anzahl der pokes in Loch drei, sondern vielmehr, dass die Tiere gezielt in das aktive Loch poken und sich danach direkt dem Futterspender zuwenden).

Nachdem der Wechsel zu Loch vier gelernt wurde, wird Loch zwei, dann Loch eins und zum Schluss wieder Loch drei aktiviert.

Phase II:

In dieser Phase ist zunächst wieder Loch drei aktiv. Nach sechs korrekten Pokes wechselt das aktive Loch nach Zufallsprinzip. Sobald die Tiere gelernt haben, in das jeweils aktive Loch zu poken, und nicht nach einem Wechsel des aktiven Lochs weiterhin in das zuvor aktive Loch poken, wird die Anzahl der Pokes, nach denen das aktive Loch wechselt, sukzessive reduziert, bis am Ende nach jedem Poke das aktive Loch wechselt.

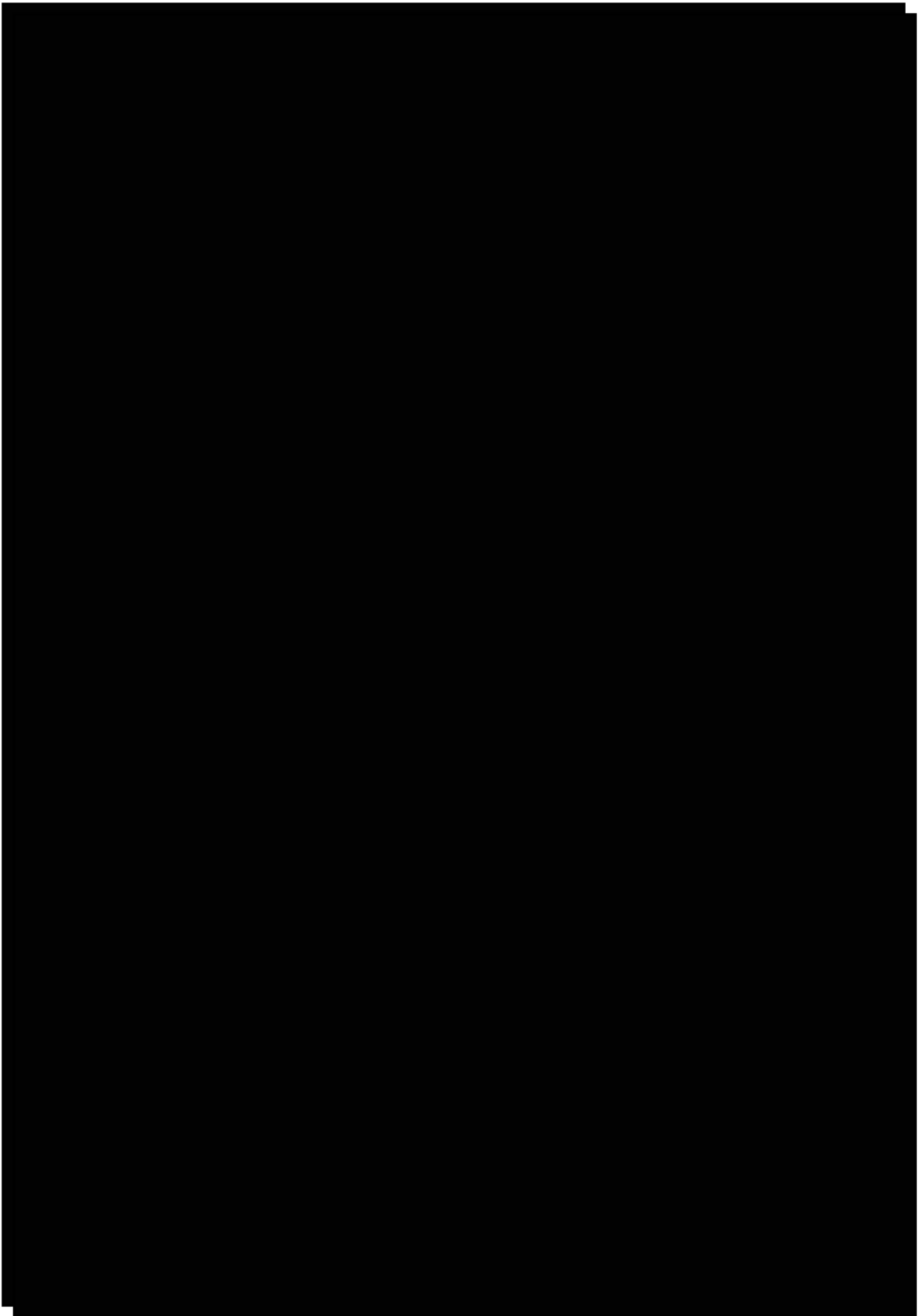
Phase III:

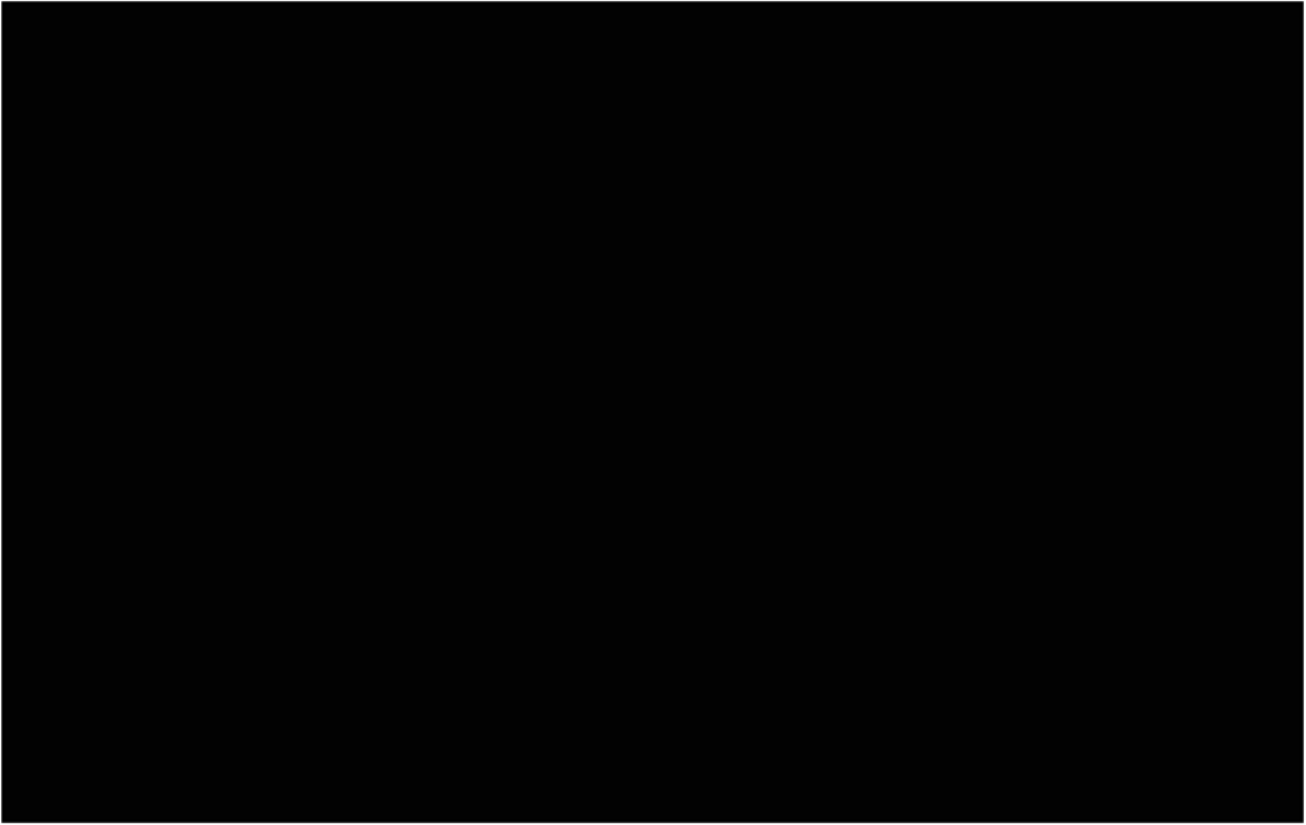
In dieser Phase wird bereits die 12-Item-Sequenz vorgegeben. Allerdings wird am Anfang noch jeder Poke verstärkt (FR 1).

Das FR-Kriterium wird schrittweise auf FR 13 gesteigert, wobei auch die Anzahl der Futterpillen pro Verstärkung steigt (FR 13: pro Verstärkung 4 Futterpillen).

ANHANG

Als letzter Schritt wird ein Zeitlimit von 5 s pro Poke eingeführt. Bei einem Ausbleiben einer Reaktion über 5 s werden ebenfalls Lichtreiz und Ton appliziert. Sobald die Belohnung geliefert wird, liegt das Zeitlimit bei 1 min, damit die Tiere ausreichend Zeit haben die Futterpillen zu konsumieren.





9.3. AKADEMISCHE TÄTIGKEITEN UND LEISTUNGEN

PUBLIKATIONEN (ERSTAUTOR):

- [1] Eckart MT, Huelse MC, McDonald RS, Schwarting RKW (2010). 6-Hydroxydopamine Lesions in the Rat Neostriatum Impair Sequential Learning in a Serial Reaction Time Task. *Neurotoxicity Research* Volume 17, Issue 3, Page 287-98.
- [2] Eckart MT, Huelse MC, Loer D, Schwarting RKW (2010). Acquisition and performance in a rat sequential reaction time task is not affected by subtotal ventral striatal 6-OHDA lesions. *Neuroscience Letters*, 476(1), 27-31.
- [3] Eckart MT, Huelse MC, Loer D, Schwarting RKW. Dorsal hippocampal lesions boost performance in the rat sequential reaction time task (in Vorbereitung).

PUBLIKATIONEN (KOAUTORENSCHAFT & ABSTRACTS):

- [1] Huelse-Matia MC, Eckart MT, Loer D & Schwarting RKW (2009). Sequential Learning in a Rat Model of the SRTT: Distinct Roles of Dorsal and Ventral Striatum. *Journal of Molecular Neuroscience*.
- [2] Dombrowski PA, Carvalho M, Miyoshi E, Correia D, Bortolanza M, Santos LM, Eckart MT, Schwarting RKW, Brandão ML, Da Cunha C. A microdialysis study of the release of dopamine in the striatum in conscious MPTP-hemilesioned rats challenged with apomorphine and amphetamine. *Behavioural Brain Research* (akzeptiert).

POSTER:

- [1] Eckart MT, Huelse Matia MC, McDonald RS, Domenger D & Schwarting RKW (2008). Sequential behaviour: effects of striatal dopamine depletions in rats acquiring a Serial Reaction Time Task, *Tagung experimentell arbeitender Psychologen*, Marburg.
- [2] Eckart MT, Huelse-Matia MC, McDonald RS & Schwarting RKW (2008). Sequential behaviour: effects of striatal dopamine depletions in rats acquiring a Serial Reaction Time Task, *Psychologie und Gehirn*, Magdeburg.
- [3] Eckart MT, Huelse-Matia MC, McDonald RS & Schwarting RKW (2008). Sequential behaviour: effects of striatal dopamine depletions in rats acquiring a Serial Reaction Time Task, *Neuroscience Conference*, Washington (USA).
- [4] Eckart MT, Huelse-Matia MC, McDonald RS & Schwarting RKW (2009). Sequential learning and performance in a rat model of Parkinson's disease, 6. *Parkinson Kongress*, Marburg.
- [5] Eckart MT, Huelse-Matia MC, McDonald RS & Schwarting RKW (2009). Implicit memory and dopaminergic basal ganglia processes: a new rat model, *Tagung der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft*, Göttingen.
- [6] Külz GB, Eckart MT, Wöhr M, Schwarting RKW (2009). Will you still come if I call you?, *Tagung der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft*, Göttingen.

ANHANG

- [7] Huelse-Matia MC, Eckart MT, Loer D & Schwarting RKW (2009). Sequential Learning in a Rat Model of the SRTT: Distinct Roles of Dorsal and Ventral Striatum, Annual Meeting of the Israel Society for Neuroscience, Eilat (Israel).
- [8] Eckart MT, Huelse MC, McDonald RS, Loer D, Schwarting RKW (2010). Competitive Functions of the Rat Striatum and Hippocampus in Sequential Learning, IBNS Meeting, (Sardinia).

VORTRÄGE:

- Eckart MT (2009). Neuropsychologische Grundlagenforschung am Beispiel eines Nagermodells zu dopaminergen Prozessen bei sequentiellern Lernen, Vortrag auf Einladung der „Gesellschaft für subjektwissenschaftliche Forschung & Praxis“, FU Berlin.
- Eckart MT (2009). Sequential Learning and Dopaminergic Lesions, Vortrag am Fachbereich Biologie der Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasilien.
- Eckart MT (2009). Sequentielles Lernen und dopaminerge Prozesse: Effekte striataler Dopaminläsionen in einem Rattenmodell der "Seriellen Reaktionszeitaufgabe", 35. Arbeitstagung Psychophysiologie und Methodik, Leipzig.

AUSZEICHNUNGEN & FÖRDERUNGEN:

- Studienstipendium der Rosa-Luxemburg-Stiftung
- Posterpreis des 6. Parkinson-Kongress (2009), Marburg
- DAAD Stipendium für zweimonatigen Forschungsaufenthalt in Curitiba, Brasilien (April/Mai 2009)

BETREUTE DIPLOMARBEITEN:

- Rebecca S. McDonald (2009). Impaired Sequential Learning in a Preclinical Rodent Model of Parkinson's Disease.
- Moriah C. Hülse-Matia & David Loer (2010). The Neurological Basis of the Rodent Serial Reaction Time Task – the Role of the Nucleus Accumbens.
- Kati Trümner (in Vorbereitung)

TEILNAHME AN KURSE/WORKSHOPS:

SS 2007 Ringvorlesung „Grundlagen der Neurowissenschaften“

05.06. – 06.06.2008. „Memory“ Workshop, Marburg

14.07. – 18.07.2008 „Computational Neuroscience“, Prof. Dr. Michael Wenger (Penn State University), Gießen

22.09. – 25.09.2008 „Hormonbestimmung und Molekulargenetik“, Prof. Dr. Jürgen Henning (Uni Gießen), Gießen

15.01. – 16.01.2009 „Cognitive Development: Language, Music, Theory of Mind“ Workshop, Schloss Rauschholzhausen

ANHANG

ABGEHALTENE SEMINARE

WS 2009/2010 Literaturseminar „Einführung in die Kritische Psychologie“

9.3. PUBLIKATIONEN – INDIVIDUELLE LEISTUNG

9.3.1. STUDIE I

Versuchs-idee:	Eckart, M.T.
Versuchs-planung	Eckart, M.T., Hülse-Matia, M.C., McDonald, R.S.
Versuchs-durchführung:	Eckart, M.T., Hülse-Matia, M.C., McDonald, R.S.
Statistische Analyse:	Eckart, M.T., Hülse-Matia, M.C., McDonald, R.S.
Verfassen der Veröffentlichung:	Eckart, M.T.
Supervision:	Schwarting, R.K.W.

Arbeitsanteil gesamt: Eckart, M.T. **50%**, Hülse-Matia, M.C. **16,67%**, McDonald, R.S. **16,67%**, Schwarting, R.K.W. **16,67%**

9.3.2. STUDIE II

Versuchs-idee:	Eckart, M.T.
Versuchs-planung	Eckart, M.T., Hülse-Matia, M.C., Loer, D.
Versuchs-durchführung:	Eckart, M.T., Hülse-Matia, M.C., Loer, D.
Statistische Analyse:	Eckart, M.T., Hülse-Matia, M.C., Loer, D.
Verfassen der Veröffentlichung:	Eckart, M.T.
Supervision:	Schwarting, R.K.W.

Arbeitsanteil gesamt: Eckart, M.T. **50%**, Hülse-Matia, M.C. **16,67%**, Loer, D. **16,67%**, Schwarting, R.K.W. **16,67%**

9.3.3. STUDIE III

Versuchs-idee:	Eckart, M.T.
Versuchs-planung	Eckart, M.T., Hülse-Matia, M.C., Loer, D.
Versuchs-durchführung:	Eckart, M.T., Hülse-Matia, M.C., Loer, D.
Statistische Analyse:	Eckart, M.T., Hülse-Matia, M.C., Loer, D.
Verfassen des Manuskripts:	Eckart, M.T.
Supervision:	Schwarting, R.K.W.

Arbeitsanteil gesamt: Eckart, M.T. **50%**, Hülse-Matia, M.C. **16,67%**, Loer, D. **16,67%**, Schwarting, R.K.W. **16,67%**

Arbeitsanteil über alle Studien: Eckart, M.T. **150%**, Hülse-Matia, M.C. **50%**, McDonald RS **16,67%**, Loer, D. **33,33%**, Schwarting, R.K.W. **50%**

9.4. ERKLÄRUNG

Ich versichere, das ich meine Dissertation

**ROLLE VON STRIATUM UND HIPPOCAMPUS IM SEQUENTIELLEN LERNEN:
INTERAKTION, DISSOZIATION ODER KONKURRENZ?**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinem sonstigen Prüfungszweck gedient.

Ort/Datum

Unterschrift